



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS
Y DE LA SALUD
INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA I.A.P.
CIENCIAS MÉDICAS

**DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DEL BIOFILM
MIXTO EN LA SUPERFICIE OCULAR DURANTE QUERATITIS INFECCIOSA
EN UN MODELO MURINO.**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:
JONATHAN URIEL QUEVEDO MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPALES
DR. VÍCTOR MANUEL BAUTISTA DE LUCIO .INSTITUTO.DE.OFTALMOLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO A 17 DE FEBRERO DE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice:

| | |
|---|----|
| Resumen estructurado | 4 |
| 1. Introducción | 7 |
| 1.1 Queratitis infecciosa | 7 |
| 1.2 Biofilm | 8 |
| 1.2.1 Estructura del biofilm | 9 |
| 1.2.2 Biofilm en oftalmología | 10 |
| 1.3 Antecedentes | 11 |
| 2. Planteamiento del problema | 13 |
| 3. Pregunta de investigación | 13 |
| 4. Justificación | 13 |
| 5. Hipótesis | 13 |
| 6. Objetivos | 14 |
| 6.1 Objetivo general | 14 |
| 6.2 Objetivos específicos | 14 |
| 7. Material y métodos | 15 |
| 7.1 Aislamiento e identificación del Microorganismo | 15 |
| 7.1.1 Obtención e identificación del patógeno | 15 |
| 7.1.2 Identificación molecular de microorganismo | 16 |
| 7.2 Formación del biofilm IN VITRO | 17 |
| 7.3 Formación del biofilm IN VIVO | 18 |
| 7.3.1 Uso animal | 18 |
| 7.3.2 Modelo de queratitis infecciosa | 18 |
| 7.3.3 Seguimiento clínico | 19 |
| 7.3.4 Preparación de muestra microscopia de luz | 20 |
| 7.3.5 Microscopia de fluorescencia | 21 |
| 7.3.6 Microscopia electrónica de transmisión | 21 |
| 8. Tamaño de la Muestra | 22 |
| 9. Variables de estudio | 23 |
| 10. Análisis estadístico | 25 |
| 11. Resultados | 26 |

| | |
|--|----|
| 11.1 Aislamiento de microorganismo | 27 |
| 11.2 Identificación molecular de microorganismo | 30 |
| 11.3 Formación de biofilm en placa | 34 |
| 11.4 Formación de biofilm IN VIVO | 44 |
| 11.4.1 Análisis clínico de queratitis | 44 |
| 11.4.2 Cortes histológicos | 51 |
| 11.4.3 Análisis histológico con fluorocromos | 56 |
| 11.4.4 Análisis microscopia electrónica de transmisión | 62 |
| Discusión | 71 |
| Conclusión | 76 |
| Aspectos éticos | 77 |
| Bioseguridad | 77 |
| Financiamiento de investigación | 77 |
| Apéndice | 78 |
| Bibliografía | 86 |

Resumen estructurado:

Introducción

La queratitis microbiana es una infección de la córnea que se asocia a un riesgo de disminución de la capacidad visual de manera permanente. La Incidencia reportada varía de 2 a 11 por cada 100,000 casos en áreas urbanas y hasta 799 por cada 100,000 en áreas rurales. Los agentes etiológicos más comunes son *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Aspergillus* y *Fusarium*. Se ha reportado resistencia a antibióticos como resultado de mutaciones cromosomales, intercambio genético y protección física cuando se agrupan en biofilm.

Un biofilm o biopelícula se define como un conjunto de microorganismos organizados en una matriz extensa de exopolímeros ricos en polisacáridos; Existe evidencia que el biofilm participa en una gran variedad de infecciones oculares. Existen reportes de un modelo de queratitis bacteriana por *Pseudomona* en la que se tipifican las fases del biofilm. No hay modelos *in vivo* desarrollados para caracterizar las infecciones corneales por biofilm mixto.

Objetivo: Determinar la presencia y estructura de biofilm en queratitis mixtas en un modelo murino.

Metodología: Se aislaron microorganismos de pacientes con queratitis infecciosa del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana. A estos se les realizó identificación macro y microscópica así como análisis molecular.

Se desarrolló un modelo *in vitro* de biofilm usando *Staphylococcus aureus*, *Fusarium solani* y una combinación de ambos.

Para el modelo *in vivo*, se infectaron los ojos de ratones machos Balb-C con *Fusarium solani*, *Staphylococcus epidermidis* y una combinación de ambos, para posteriormente determinar la presencia del biofilm y caracterizar sus componentes mediante microscopía óptica de luz clara, de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión.

Resultados:

En el modelo *in vitro* de biofilm usando *Staphylococcus*, *Fusarium* y una mezcla de ambos, las placas de cultivo se tiñeron con cristal violeta y se midieron sus absorbancias (Abs 490nm), encontrando una diferencia promedio con respecto al grupo control de 0.4076 para el grupo de infección con *Fusarium*, de 0.0811 para el grupo de infección con *Staphylococcus aureus* y de 0.2909 para el grupo de infección mixta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). El biofilm fue observado en microscopio de fluorescencia analizando la tinción con los fluorocromos Calcofluor, Flamingos y Yoduro de Propidio encontrando condensación de emisión intercelular de bordes irregulares. Estas imágenes fueron encontradas en ambas biofilms individuales. En el biofilm mixto de *F. solani* y *S aureus* la emisión de fluorescencia fue mayor de predominio en las cercanía de las hifas en proceso de apoptosis.

Para el modelo *in vivo* de queratitis se observó que los ratones con coinfección presentaron un defecto epitelial mayor (1.31mm) que los inóculos por separado aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.269$)

Las córnea observadas al microscopio de luz clara, fluorescencia y electrónico mostraron en los tres grupos de infección un cúmulo de microorganismos intraestromales, rodeados por un infiltrado de matriz extracelular con emisión de fluorescencia y sobrelapamiento de los fluorocromos; se observaron también un gran número de células inflamatorias de predominio polimorfonucleares, únicamente en el grupo de infección mixta se observó la presencia de células cebadas en el borde de la úlcera.

Conclusiones: Los resultados de este estudio dan evidencia directa de la existencia de un biofilm en la córnea de ratón ante una infección inducida por *Fusarium solani*, *Staphylococcus aureus* y la combinación de ambos. Los resultados sugieren que los biofilms maduros son un componente de las queratitis infecciosas.

Esta información puede ser útil para determinar el impacto del biofilm en los esfuerzos terapéuticos.

1. Introducción:

1.1 Queratitis infecciosa.

La queratitis microbiana es una infección de la córnea asociada a un riesgo de disminución de la capacidad visual de manera permanente. La severidad de la infección corneal depende usualmente de la condición y estructura corneal subyacente y de la patogenicidad del agente causal. Los síntomas de esta enfermedad son disminución de la visión, fotofobia y presentación rápida de dolor en grado variable. Los signos encontrados en la evaluación son el infiltrado corneal inflamatorio con bordes no delimitados, pérdida del tejido estromal y edema estromal subyacente, reacción de cámara anterior con o sin hipopion, pliegues en capa de Descemet, edema de párpado superior, inyección ciliar y en algunos casos placas endoteliales inflamatorias. Un gran número de pacientes tienen una evolución pobre si la terapia antimicrobiana apropiada no es administrada de forma oportuna (Murillo-López 2014).

Las queratitis pueden estar originadas por bacterias, virus, hongos, protozoarios y/o parásitos. La incidencia reportada varía de 2 a 11 por cada 100,000 casos al año en áreas urbanas y hasta 799 por cada 100,000 al año en áreas rurales. La incidencia y etiología depende del entorno y factores ambientales. (Makdoui K *et al*, 2010)

Los factores de riesgo para el desarrollo de queratitis infecciosa incluyen trauma ocular, uso de lente de contacto, cirugía ocular reciente, enfermedades de la superficie ocular, ojo seco, deformidad del párpado, uso crónico de esteroides e inmunosupresión sistémica (Green M. *et al* 2008). Los agentes etiológicos más comunes responsables de las queratitis bacterianas por orden de frecuencia son *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y finalmente *Staphylococcus*. (Bourcier, 2013)

La incidencia de queratitis micótica oscila del 2 al 35% de los episodios y depende de la región analizada es más frecuente en las tropicales en donde *Aspergillus* es el agente etiológico encontrado. *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* fueron

causantes de un brote de queratitis fúngica asociada a lente de contacto por contaminación en el líquido limpiador de lentes de contacto localizado en Estados Unidos, Europa y Singapur (Thomas PA, 2013).

En un estudio retrospectivo en 10 años de análisis en un centro de referencia de la Ciudad de México se reportó una prevalencia de 38% de úlceras bacterianas. De estas el *Staphylococcus aureus* el agente causal en 45% de los casos. Una menor proporción se reporta para queratitis de etiología micótica, causantes en un 12% del total de las úlceras. *Fusarium* fue el agente etiológico más frecuentemente aislado en el 50% de los casos. (Hernández-Camarena et al 2015)

Los microorganismos desarrollan resistencia a antibióticos como resultado de mutaciones cromosomales, intercambio genético y protección mecánica cuando se agrupan en biofilms. La presencia de microorganismos multiresistentes es un problema pues puede complicar el tratamiento y la rehabilitación corneal (Vazirani J. 2013).

1.2 Biofilm

Biofilm se define como un conjunto de microorganismos organizados en una extensa matriz de exopolímeros ricos en polisacáridos; los microorganismos dentro del biofilm son difíciles de erradicar por una terapia antimicrobiana convencional y pueden causar infecciones resistentes a fármacos convencionales (Elder MJ, 1999).

Bajo ciertas condiciones ambientales como la limitación de nutrientes, algunas bacterias pueden secretar y residir en un polímero de glucocaliz; lo anterior le confiere protección relativa a las respuestas humorales y celulares de la inmunidad del huésped, así como a antibióticos y surfactantes. Se ha reportado que las bacterias dentro de los biofilms son de 20 a 1000 veces más resistentes a antibióticos comparados con bacterias de vida libre en forma planctónica. La formación del biofilm confiere protección al microorganismo del estrés ambiental por contaminantes, depleción nutricional o desequilibrios del medio (Chandra et al 2014).

La formación de biofilm es un ciclo interminable donde las comunidades de microorganismos se embeben en una matriz extracelular polimérica que une a los microorganismos entre si y a la superficie donde se encuentran. La matriz está constituida por exopolisacáridos (EPS) que componen el 85% del total de la biofilm y el resto está compuesto por DNA extracelular y polipeptidos altamente hidratados y polares, esta mezcla contribuye a la arquitectura general del biofilm. (Rasamiravaka et al 2015).

La formación del biofilm es un proceso controlado genéticamente en el ciclo de vida de un microorganismo y es resultado de un gran número de cambios en su fisiología celular, incluyendo un aumento en la resistencia a antibióticos comparado con el crecimiento en condiciones planctónicas (Zegans et al, 2002).

1.2.1 Estructura del biofilm

El crecimiento microbiano se caracteriza como biofilm cuando el microorganismo se une a la superficie acelular y/o a otro microorganismo y además esta presente una matriz extracelular. Esto se distingue del modo planctónico o de vida libre en que en estos últimos no hay interacciones presentes.

El proceso de formación del biofilm consta de las siguientes fases. (Rasamiravaka et al. 2015)

- Fase I: Adhesión de microorganismos planctónicos a una superficie, biótica o abiótica, que permita su crecimiento.
- Fase II: Unión irreversible de la bacteria e inicio de la formación de microcolonias en matriz de EPS
- Fase III: Expansión progresiva de microcolonias llevando a un fenotipo más estructurado en el espacio no colonizado.
- Fase IV: Cobertura de toda la superficie y crecimiento tridimensional
- Fase V: Dispersión de bacterias a formas planctónicas para colonizar nuevas superficies.

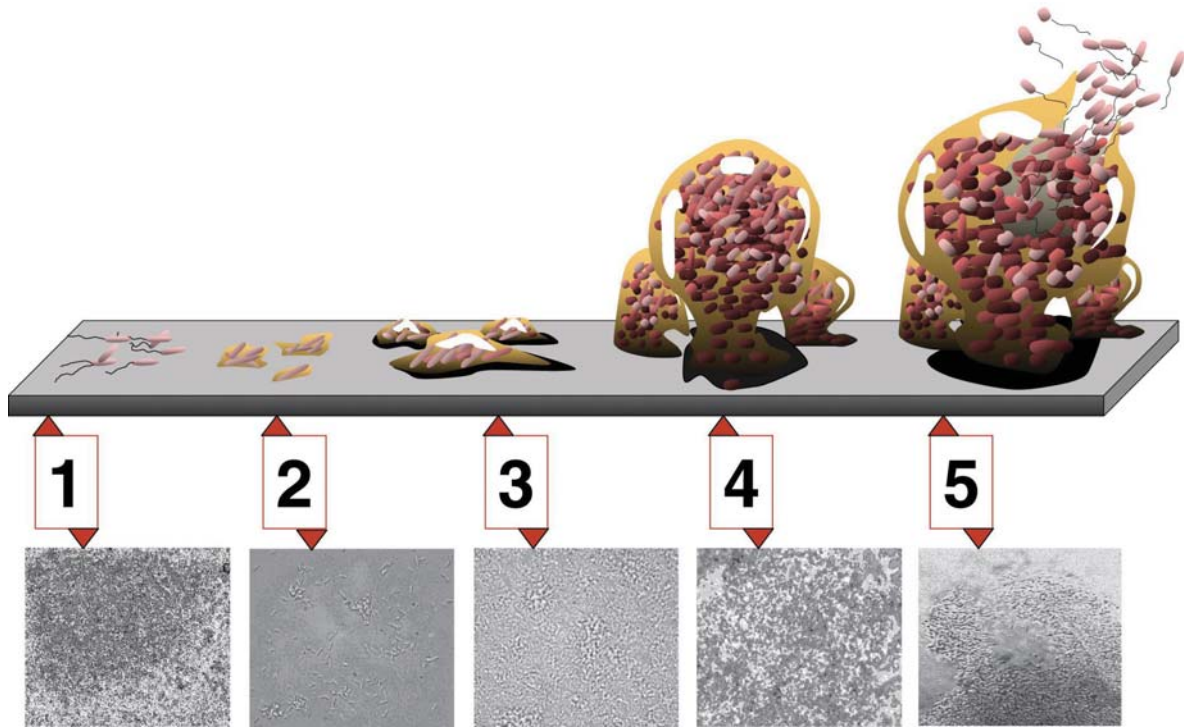


Figura 1. Esquema ilustrando las fases de formación de la biofilm.

1.2.2 Biofilm en Oftalmología

Existe evidencia que los biofilms juegan un papel importante en una gran variedad de infecciones oculares. La presencia de biofilms bacterianos ha sido demostrada en dispositivos médicos usados en oftalmología tales como lentes de contacto, cerclajes esclerales, lentes intraoculares y material de sutura (Zagans et al. 2002).

Muchas infecciones oculares ocurren cuando dichos materiales protésicos entran en contacto con o son implantados en el ojo. El 56% de las úlceras corneales en los Estados Unidos están asociado al uso de lentes de contacto (Paulo, 2015).

Los biofilms pueden participar en las infecciones oculares al permitir al microorganismo persistir en superficies abióticas que entran en contacto con o son implantados en el ojo y formar así, directamente un biofilm en la superficie biótica ocular. Se observa una alta prevalencia de organismos Gram negativos (este tipo de microorganismos no se encuentran como microbiota de la superficie ocular) entre los aislados de queratitis bacterianas asociadas a uso de lentes de contacto, Su habilidad para adherirse a diferentes materiales de lentes de contacto ha sido

demostrada *in vitro* y se explica por la hidrofobicidad de sus materiales (Lichtinger et al, 2012).

1.3 Antecedentes

La formación de biofilms bacterianos y fúngicos se ha estudiado usando una gran cantidad de sustratos y condiciones de crecimiento. Los modelos *in vivo* han servido como instrumentos para resolver preguntas básicas sobre la formación del biofilm, su fisiología y arquitectura. En general mimetizan los contrastes de la biología del biofilm, como los diferentes gradientes de nutrientes, gases y productos metabólicos, así como una alta densidad de células y matriz extracelular (Paulo, 2015).

Las técnicas para estudiar los modelos *in vitro* involucran el uso de LASER confocal, microscopia electrónica, ensayos de actividad metabólica, medidas de peso en seco (medición de biomasa por el método de Christensen) y ensayos de susceptibilidad antimicrobiana usados por investigadores para evaluar la morfología del biofilm (Coenve, 2010).

Se han descrito modelos *in vivo* para caracterizar el biofilm en infecciones pulmonares, de vías áreas superiores, cistitis, prostatitis, pielonefritis, colitis infecciosas, colecistitis, infecciones cutáneas crónicas, endocarditis, otitis media, sinusitis, caries dental, periodontitis y osteomielitis. Todas en animales, tales como: ratón, rata y conejo, primates y porcinos (Lebeaux et al 2013).

Existe un estudio de serie de casos en pacientes con queratopatía cristalina infecciosa en quienes mediante el uso de microscopia electrónica de transmisión encontraron la presencia de una matriz extracelular rodeando a los microorganismos dando la inferencia de ser un biofilm bacteriano. (Fulcher et al, 2001).

Existe un modelo murino de queratitis infecciosa de etiología bacteriana por *Pseudomonas aeruginosa*, para determinar las diferentes fases de la formación de biofilm. Con el uso de tinción de gram y microscopia electrónica de barrido y

transmisión los autores describieron las bacterias unidas al estroma corneal y embebidas a una densa matriz de sustancia polimérica extracelular, así como secreción de glucocalix durante 7 días. (Saraswathi P et al, 2016)

Otros autores han desarrollado métodos experimentales para modificar los biofilms, los cuales usaron macrólidos (en concreto la claritromicina) para alterar la producción del biofilm y el uso de enzimas para digerirlos (Sadaka et al, 2012).

2. Planteamiento del problema:

La queratitis infecciosa es un problema de salud que se presenta hasta en 799 casos por cada 100,000 habitantes al año. Estas infecciones generan secuelas como la disminución importante de la capacidad visual y se ha relacionado con la resistencia al tratamiento antibiótico convencional, muy probablemente por protección mecánica de los biofilm. Los usuarios de lente de contacto y pacientes con trauma son grupos vulnerables. Al momento no hay información sobre la presencia, estructura y composición del biofilm mixto en un modelo *in vivo*

3. Pregunta de investigación:

¿Cuál es la estructura y la composición del biofilm en las queratitis de etiología bacteriana, micótica y mixta en un modelo *in vivo*?

4. Justificación:

Al estudiar la estructura y composición del biofilm desarrollado en un modelo *in vivo* de queratitis infecciosa nos permitirá entender la participación de este en las infecciones oculares, y así mismo generará conocimiento para futuras estrategias antimicrobianas en oftalmología, y reducir el tiempo de recuperación así como las repercusiones en la visión del paciente.

5. Hipótesis:

La generación de una queratitis infecciosa en un modelo murino producirá un biofilm con características específicas y similares al desarrollado en el humano.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general:

- Determinar la formación y estructura del biofilm en queratitis infecciosa establecida en un modelo murino.

6.2 Objetivos específicos:

- Desarrollar un modelo murino de formación de biofilm bacteriano, fúngico y mixto.
- Definir los componentes estructurales y su disposición en el biofilm en la queratitis bacteriana, fúngica y mixta en un modelo animal.
- Comparar la estructura del biofilm del modelo *in vivo* contra el *in vitro* según los mismos microorganismos.

7. Material y Métodos:

FASES DEL PROTOCOLO

- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS
 - IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA
 - IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA
 - IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

- FORMACIÓN DE BIOFILM IN VITRO
 - ANÁLISIS CUANTITATIVO
 - ANALISIS CUALITATIVO

- FORMACIÓN DE BIOFILM IN VIVO
 - FASE CLÍNICA DEL MODELO
 - ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO (MICROSCOPIA CAMPO CLARO, FLUORESCENCIA Y ELECTRÓNICA)

7.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

7.1.1 Obtención e identificación de patógenos

Se obtuvieron bacterias y hongos de aislados clínicos de pacientes con queratitis infecciosa atendidos en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana.

Para ello se utilizaron placas de Agar Sangre (Biomerieux, Francia) en el caso de bacterias y de Agar Sabouroud Dextrose (Biomerieux, Francia) para hongos; ambos en condiciones de esterilidad.

La identificación microscópica se realizó con tinción de Gram para determinar la morfología de las bacterias aisladas.

Para la observación microscópica se le agregó al frotis una gota de la solución de hidróxido de potasio (KOH). Tras un periodo de tiempo para permitir la clarificación de la muestra por el KOH, la preparación se examinó en microscopio de campo claro con el objetivo 100x.

7.1.2 Identificación molecular de los microorganismos:

Extracción de DNA

Para la extracción del DNA cromosómico se partió de un cultivo de *S. aureus* y *Fusarium solani*. Las colonias se resuspendieron en 100 microlitros de un buffer de lisis (6nM Tris-HCl pH8, 1 M NaCl, 0,1 M EDTA pH8, 0.2% desoxicolato sódico y 0,5% sarcosil, junto con enzimas líticas lisozima a concentraciones de 50µg/mL). Esta suspensión se incubó a 37°C durante 30 minutos y posteriormente 5 minutos a 95°C. La solución de lisado se diluyó 1/100 en TE y de esta se tomó el DNA molde para la reacción de amplificación.

Amplificación de DNA (Reacción en Cadena de la polimerasa)

La reacción de amplificación del DNA se llevó a cabo con un termociclador Axygen y con la enzima Ampli Taq Gold (Applied Biosystems). En cada reacción se utilizaron los siguientes componentes: Buffer de PCR a una concentración de x1. MgCl₂ a 1.5mM, dNTPs a 250µM, los iniciadores del gen 16S e ITS (*Staphylococcus* y *Fusarium* respectivamente) a una concentración de 50 pM. A la mezcla se le añadieron 2 unidades de TaqDNA polimerasa y 5 µL del DNA molde a una concentración de 150 pmol/µL y finalmente se añadió agua hasta completar el volumen final de 25 µL.

Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 12 minutos para la desnaturalización inicial a 94°C, seguido de ciclos de amplificación (45 segundos para desnaturalizar a 94°C, 45 segundos para el alineamiento 55°C y 1 minuto a 72°C para el proceso de extensión), y una última fase de extensión de 2 minutos a 72°C y posterior enfriamiento hasta 4°C.

Tabla 1. Secuencia de Primers usados para la reacción en cadena de la polimerasa. Gen 16S para identificar *Staphylococcus aureus* e ITS para *Fusarium solani*. (Adderson et al.,2000, Dyavaiah et al., , 2007)

| Primer | Secuencia | Amplicon |
|--------|----------------------------------|----------|
| 16S F | 5'...TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTC...3' | ≈1500 pb |
| 16S R | 5'...ACGTCATCCCCACCTTCCTC...3' | |
| ITS F | 5'...TCCGTAGGTGAACCTTGCGG...3' | ≈500 pb |
| ITS R | 5'...TCCTCCGCTTATTGATATGC...3' | |

Detección y secuenciación de amplicones.

Los fragmentos de DNA amplificados fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en 0.5xTBE (50mM Tris, 50 mM ácido bórico y 0,2 mM EDTA pH8) a 120 voltios durante 60 minutos. Se tiñó con bromuro de etidio durante 30 minutos. La visualización de los amplificados se realizó sobre un transiluminador de luz ultravioleta.

7.2 FORMACIÓN DE BIOFILM *IN VITRO*.

Se realizó una preparación agregando un inóculo a una concentración de 1.5×10^8 células por mililitro de *Staphylococcus aureus* y otro a una concentración de 1×10^5 conidios por mililitro de *Fusarium solani* ambas aforadas a 200µl de medio de cultivo DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) en pozos de una microplaca de ELISA y se incubaron a 37°C por 72 horas.

En una tercera preparación se agregó un inóculo de 1×10^5 conidios por mililitro de *Fusarium solani* seguido de un inóculo de 1.5×10^8 células por mililitro de *Staphylococcus aureus* aforado a 200µl de medio de cultivo DMEM-F12. Después de un primer lavado con PBS. Se removieron los conidios no adheridos a las 4

horas, tanto del cultivo fúngico como del mixto.

A las 72 horas se removió el contenido y cada pozo se lavó tres veces con 250µl de PBS. Luego se llenaron con 200µl de metanol al 99% y se incubaron por 15 minutos para después retirar el metanol de los pozos y dejarlos secar. Una vez secos, cada pozo fue teñido con 200µl de cristal violeta de Hucker al 2% y después de 5 minutos se lavaron en agua corriente y se dejaron secar.

El material adherido a las paredes de los pozos fue resolubilizado con 160µl de ácido acético glacial y fue leído a 490nm en un lector de microplacas (Modelo BioRad550, EU)

7.3 FORMACIÓN DE BIOFILM *IN VIVO*

7.3.1 Uso animal

Se utilizaron 30 ratones machos BALB-C de entre 7 a 8 semanas de edad.

Los animales fueron manejados y cuidados de acuerdo con la norma oficial mexicana cuidado de la producción y uso de animales de laboratorio: NOM-062_ZOO-1999, y según las guías de práctica sobre experimentación en animales de la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO).

7.3.2 Modelo de queratitis infecciosa.

Inicialmente los ojos derechos de los ratones se corroboró con lámpara de hendidura la no existencia de alteraciones previas en superficie corneal, vascularización u otros defectos.

Seguido se realizó inmunosupresión sistémica con Ciclofosfamida 180mg/kg y Metilprednisolona 100mg/kg administradas vía intraperitoneal los días 5, 3 y 1 previo a la infección.

Antes de realizar la inoculación; los ratones fueron anestesiados con 50mg/kg de hidrocloreuro de Ketamina y 5mg/kg de xilazina al 2% por vía intraperitoneal. Con la ayuda de microscopio quirúrgico se realizó un canal intraestromal (pocket o cartera) de 2 – 3mm en meridianos horizontales de periferia al centro de la córnea

usando un cuchillete quirúrgico modificado de 15 grados (BD Beaver)

Tres grupos de ratones recibieron diferentes inoculos:

- Grupo I (10 ratones) infectados con *Staphylococcus aureus*
- Grupo II (10 ratones) infectados con *Fusarium solani*
- Grupo III (10 ratones) infectados con *Fusarium solani* y *Staphylococcus aureus*.

En cada caso se inoculó 3 microlitros de suspensión del concentrado de:

1×10^5 conidios por mL para el caso del grupo I

1.5×10^8 para el caso del grupo II.

En el caso del grupo III, primero se inóculo de 3 microlitros de *Fusarium solani* y después los 3 microlitros de *Staphylococcus aureus*. La concentración de microorganismo del grupo III fue la misma que las infecciones individuales.

7.3.3 Observación y seguimiento clínico

Se realizó análisis con lámpara de hendidura portátil durante el seguimiento de la infección, se tomaron fotografías clínicas bajo luz natural cada 24 horas hasta el término del estudio.

Terminando el seguimiento los ratones fueron sacrificados y los ojos fueron enucleados, la córnea se extrajo en condiciones de esterilidad. El análisis de las córneas fueron hechos por cuadrantes.

El primer cuadrante fue sembrado en SDA (Agar Sabouraud Dextrose; Sigma) en el caso de *Fusarium* y en el caso de *Staphylococcus* se sembró en BHI (Brain Heart Infusion; Biomerieux, Francia). El segundo fue procesado para su análisis con Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El tercero fue incluido en parafina para su observación con microscopía de luz. El último, procesado para observación con microscopía electrónica.

7.3.4 Preparación de la muestra para microscopia de luz:

El cuadrante destinado a la microscopia de luz fue fijado en formol absoluto. Al inicio la muestra se inició el paso de deshidratación de manera gradual pasando de un gradiente de menor a mayor del agente deshidratante iniciando con alcohol al 0.5% hasta llegar al 100%

Se colocó la muestra de tejido en un recipiente de Xilol, que solo es soluble en alcohol al 100% como paso de aclaramiento.

Se infiltró parafina líquida disolviendo el medio de aclaramiento y penetró al tejido. Se logró colocando la muestra en un recipiente y agregando la parafina fundida a 60°C colocando la muestra a esa temperatura durante 3 horas.

Después se colocó la pieza y parafina fundida en un molde rectangular dejando a temperatura ambiente hasta solidificación.

El bloque de parafina fue cortado en micrótopo realizando cortes de 5 micrómetros teniendo particular atención en el área de la úlcera corneal.

El corte obtenido del micrótopo fue montado en un portaobjetos utilizando gelatina 1% a 38°C utilizado como adhesivo para posteriormente ser almacenado en éter y alcohol al 50%.

Para teñir un corte de parafina, previamente se eliminó la parafina, desparafinamos con xilol 3 veces 5 minutos cada vez. Luego se realizó hidratación que se hace con una serie decreciente de alcohol. Utilizamos primero etanol absoluto, luego etanol al 90%, etanol 70% y agua destilada, 5 minutos cada vez.

Después de cada coloración hubo que hacer lavado. En el caso de la hematoxilina de Harris (color púrpura) se dejó 2 minutos. El lavado se hizo con agua corriente. Y luego lavamos con agua destilada durante 2 minutos. Posteriormente se tiñó con eritrosina acuosa 1% por 2 minutos; lavamos con agua destilada 2 minutos. Finalmente, para colocar el cubreobjetos, previamente deshidratamos con etanol 96% por 2 minutos y posteriormente etanol absoluto 2 veces, durante 5 minutos.

Aclaremos con xilol 2 veces por 5 minutos.

Las laminillas resultantes se observaron en microscopio óptico.

7.3.5 Microscopia de fluorescencia.

Para la microscopia de fluorescencia las muestras se desparafinarán y rehidratarán con alcoholes, comenzando con alcohol absoluto por 30 minutos y disminuyendo la concentración de alcohol en un 10% entre cada paso, incubando por 30 minutos cada fluorocromo; repitiendo este proceso hasta llegar a alcohol al 10%.

Las muestras se teñirán con 30 microlitros de blanco de calcoflúor al 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (BD reagents) y 30 microlitros de yoduro de propidio a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma Aldrich) y 30 microlitros de Flamingo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Bio-Rad) para ser observados en el microscopio de fluorescencia.

Se utilizó una combinación de tinciones fluorescentes; calcofluor, yoduro de propidio y flamingos para analizar la conformación del biofilm microbiano. Las imágenes de reconstrucción se utilizaron para determinar la arquitectura y grosor de la matriz extracelular.

7.3.6 Microscopia electrónica de transmisión

Para la fijación de la muestra, el tejido fue colocado en una solución de Glutaraldehido al 2.5% en PBS de Sörensen, por una hora en temperatura ambiente para posteriormente hacer 3 lavados de 5 minutos cada uno, con PBS de Sörensen.

Se montaron en un molde de silicón con Agar 3% para posicionar y dirigir anatómicamente las muestras colocado a temperatura ambiente hasta su completa solidificación. El Agar se cortó de manera que la muestra quedara orientada al borde del molde para facilitar la orientación de los cortes.

Se agregó solución de tetraóxido de Osmio al 1% en H_2O por una hora para posteriormente hacer 3 lavados con PBS y así retirar el exceso de Osmio.

Se realizó deshidratación con etanol en gradiente del 30 al 100% (Primer paso del 30 a 90% y 3 veces el cambio al 100%) durante 10 minutos.

Se realizó inmersión en óxido de propileno alternando las concentraciones con Resina EPON812 alternando de la siguiente manera (cada paso de una hora):

- 2-1
- 1-1
- 1-3

Se realizó cambio a Resina al 100% durante 2 horas, como mínimo. Inmediatamente se colocó en molde de inclusión de silicón para etiquetado y se cubrió con mas resina, durante 24 horas a 60°C.

Los cortes de la muestra se realizaron con un ultramicrotomo Leika modelo EMUC7 haciendo cortes semifinos de 500nm hasta alcanzar la lesión y posteriormente finos de 70nm para observación al microscopio electrónico de transmisión.

Los cortes fueron colocados en rejillas de cobre de 200 mallas.

Las muestras fueron contrastadas con citrato de plomo de Reynolds alternando con acetato de uranilo al 4% durante 5 minutos cada uno.

Finalmente las muestras fueron observadas con un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo JEM1010 a con voltaje de aceleración de 60Kv.

8. Tamaño de la muestra:

Para obtener un poder de 75% se utilizó la fórmula para comparar la proporción de presencia de biofilm esperada en el estudio (90%) y una proporción teórica reportada de aparición de biofilm en un modelo murino de cistitis (90%) (Guiton PS1, *et al*, 2010)

$$n = \left(\frac{z_{\alpha} \sqrt{2 p(1-p)} + z_{\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}}{p_1 - p_2} \right)^2$$

N=10 por cada grupo de estudio

9. Variables de estudio:

Variable independiente: Infección con *Staphylococcus aureus*, *Fusarium solani* o ambos.

Variables dependientes:

9.1 Variables clínicas:

| VARIABLE | TIPO | UNIDAD DE MEDIDA | INSTRUMENTO DE MEDICIÓN |
|--------------------------------------|-----------------------|--------------------|---|
| Presencia de la úlcera | NOMINAL DICOTÓMICA | SI / NO | Biomicroscopia con lámpara de hendidura |
| Tamaño de la úlcera medida. | CUANTITATIVA DISCRETA | Milímetros | Biomicroscopia con lámpara de hendidura |
| Presencia de infiltrado inflamatorio | CUANTITATIVA DISCRETA | Milímetros | Biomicroscopia con lámpara de hendidura |
| Presencia de lisis corneal | NOMINAL DICOTÓMICA | SI / NO | Biomicroscopia con lámpara de hendidura |
| Presencia de vascularización | NOMINAL DICOTÓMICA | Presente o ausente | Biomicroscopia con lámpara de hendidura |

9.2 Variables microbiológicas:

| VARIABLE | TIPO | UNIDAD DE MEDIDA | INSTRUMENTO DE MEDICIÓN |
|----------------------------------|-----------------------|------------------|--|
| Presencia de microorganismo | NOMINAL DICOTÓMICA | SI /NO | Cultivo / Microscopia Amplificación 16S / ITS en PCR |
| Presencia de biofilm | NOMINAL DICOTÓMICA | SI /NO | Microcopia fluorescencia / electrónica |
| Presencia de matriz extracelular | NOMINAL DICOTÓMICA | SI /NO | Microcopia fluorescencia / electrónica |

9.3 Variables de estructura y composición de biofilm

| VARIABLE | TIPO | UNIDAD DE MEDICIÓN | INSTRUMENTO DE MEDICIÓN |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------|---|
| Presencia de Proteínas | NOMINAL DICOTÓMICA | SI / NO | Microscopia fluorescencia con tinción Flamingos |
| Presencia de Carbohidratos | NOMINAL DICOTÓMICA | SI / NO | Microscopia fluorescencia con tinción de PAS |
| Presencia de Ácidos Nucleicos | NOMINAL DICOTÓMICA | SI / NO | Microscopia fluorescencia con tinción de yoduro de propidio |
| Estructura de la biopelícula | ORDINAL | | Microscopia fluorescencia con tinción de yoduro de propidio, calcofluor y Flamingos |

10. Análisis estadístico:

La descripción de las características del biofilm se realizó con frecuencias simples y para las variables nominales y con medias y sus desviaciones estándares para las variables cuantitativas. Para la comparación de las variables de los grupos se utilizó prueba de ANOVA para grupos independientes en el contraste de variables cuantitativas. Para un nivel de significancia se tomo una $p < 0.05$.

11. RESULTADOS:

11.1 FASE DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS:

Staphylococcus aureus

El asilado clínico fue cultivado en placas de agar sangre y posterior a 48 horas de incubación se observaron colonias (FIGURA 2) con las siguientes características:

- Colonias lisas, brillantes y convexas.
- Se observó un endopigmento color amarillo- naranja a blanco porcelana color dorado
- Halo de hemólisis beta.

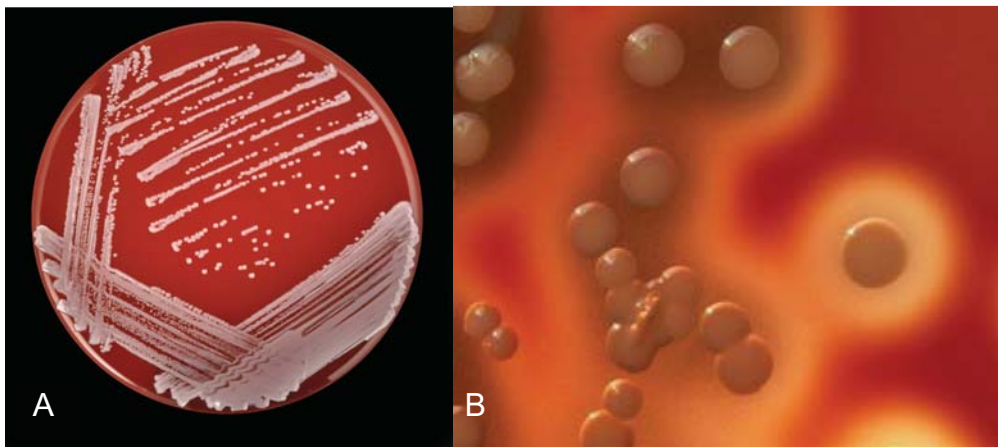


Figura 2. A) Cultivo de *S. aureus* en Agar Sangre visión macroscópica a 48 horas, en donde se observan colonias aperladas, agrupadas en racimos de forma irregular siguiendo el trascurso del estriado. B) Colonias de *S. aureus* con anillo hemolítico beta.

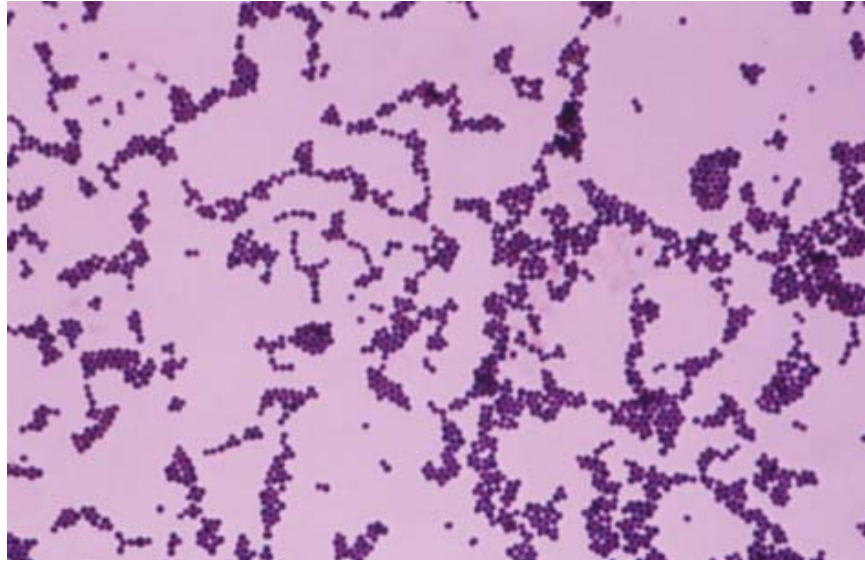


Figura 3. Frotis de S. aureus teñido con Gram, observado con microscopio de luz campo claro (10X).

Fusarium solani

El asilado clínico fue cultivado en placas de agar Sabouraud como se muestra en la Figura 4 se hizo evidente macroscópicamente las colonias de color blanco, crema, pardo claro o pardo rojizo mezcladas con zonas de color púrpura; la textura se apreció algodonosa o lanosa.

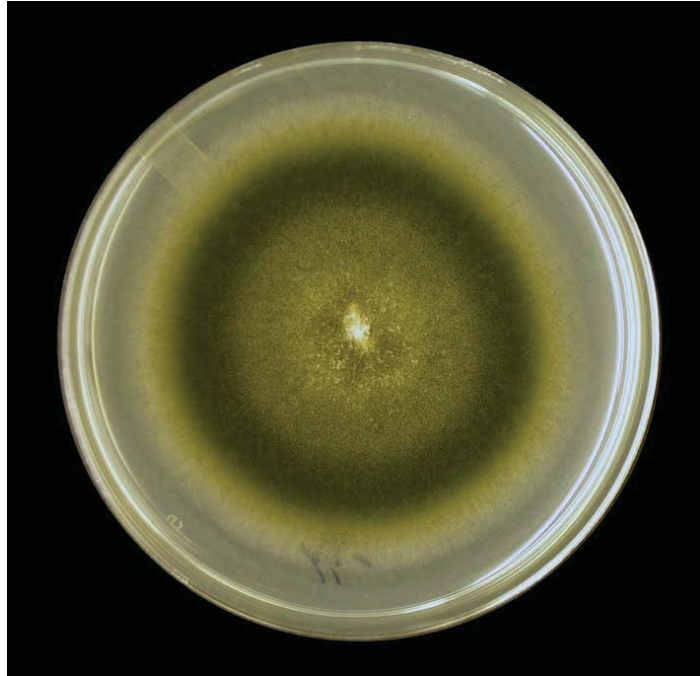


Figura 4. A. Cultivo de Fusarium solani en Agar Sabouraud visión macroscópica a 5 días de cultivo donde se observan colonias algodonosas color pardo clara.

Bajo la observación microscópica se evidenciaron macroconidias en masas mucosas, hialinos, mayormente con tres septos, ligeramente curvados, fusiformes, pero con extremos redondeados (Figura 5).

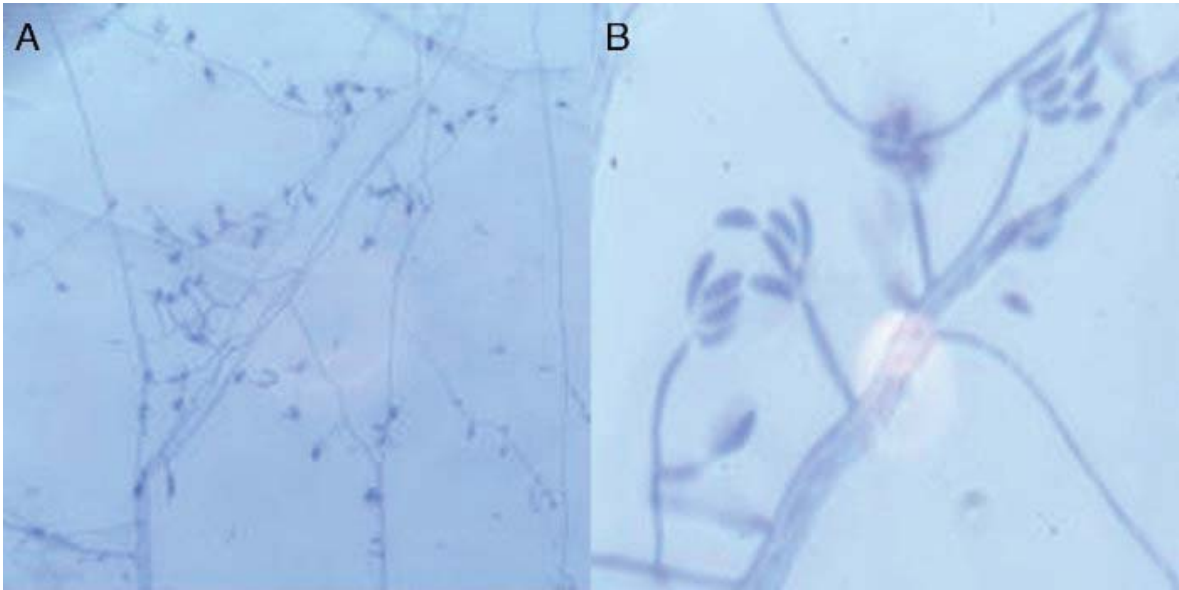


Figura 5 Micrografía de frotis de Fusarium solani teñido con hidróxido de potásio (KOH) observado con microscopio de luz clara, aumento 10X (A) y 40X (B).

11.2 Identificación molecular de microorganismos:

Los genes 16S e ITS aparecen como amplicones de 1500pb y 500pb aproximadamente.

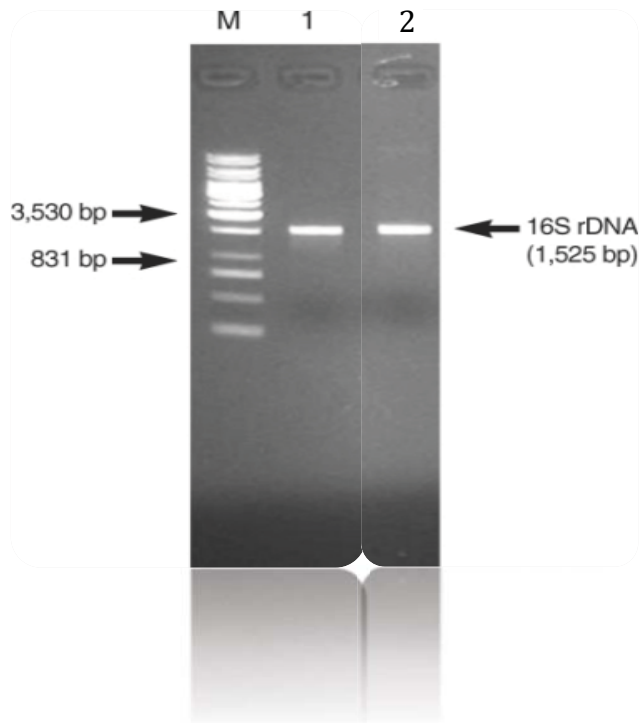


Figura 6. Gel de agarosa, donde se observan los amplicones resultados de PCR para los genes 16S, en dos muestras de la bacteria (carriles 1 y 2), el carril M corresponde al marcador de peso molecular.

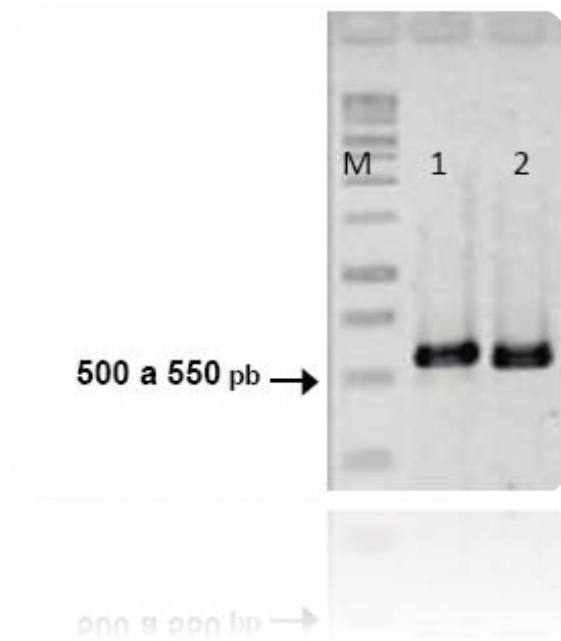


Figura 7. Gel de agarosa, donde se observan los amplicones de PCR para los ITS con peso molecular de aproximadamente 500 pb. en dos muestras del hongo (carriles 1 y 2), el carril M corresponde al marcador de peso molecular.

Análisis de la secuenciación:

Así para cada gen se obtuvo un perfil de secuenciación el cual fue comparado en la base de datos (BLAST) comprobando su correlación con cepas de *Staphylococcus aureus* y *Fusarium solani*.

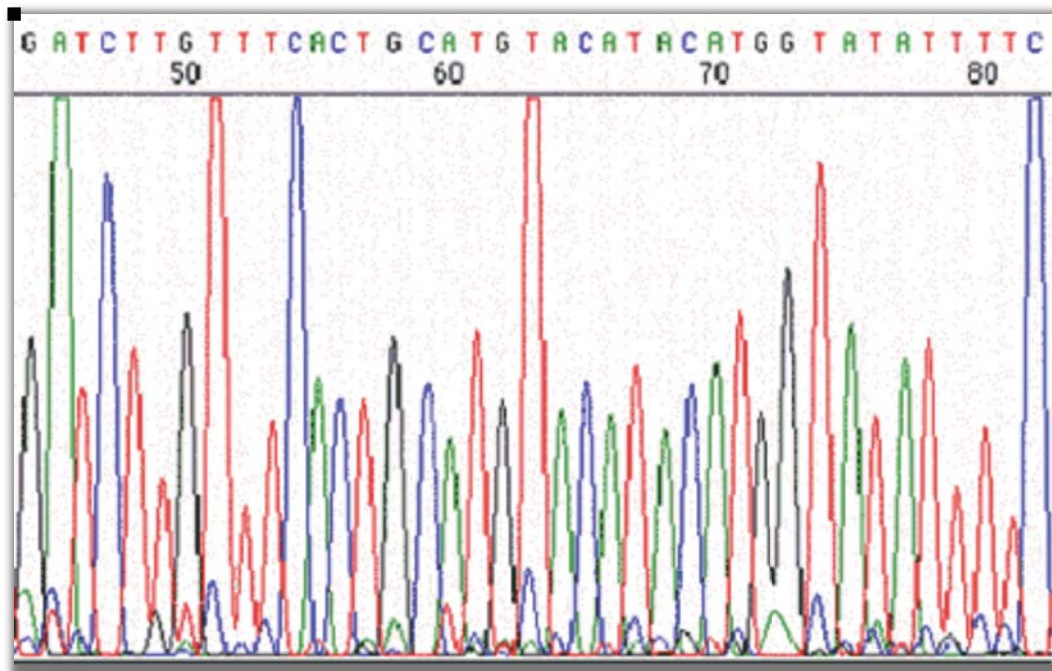


Figura 8 *Secuenciación de amplificados de los genes 16S obtenido por PCR del aislado clínico bacteriano*

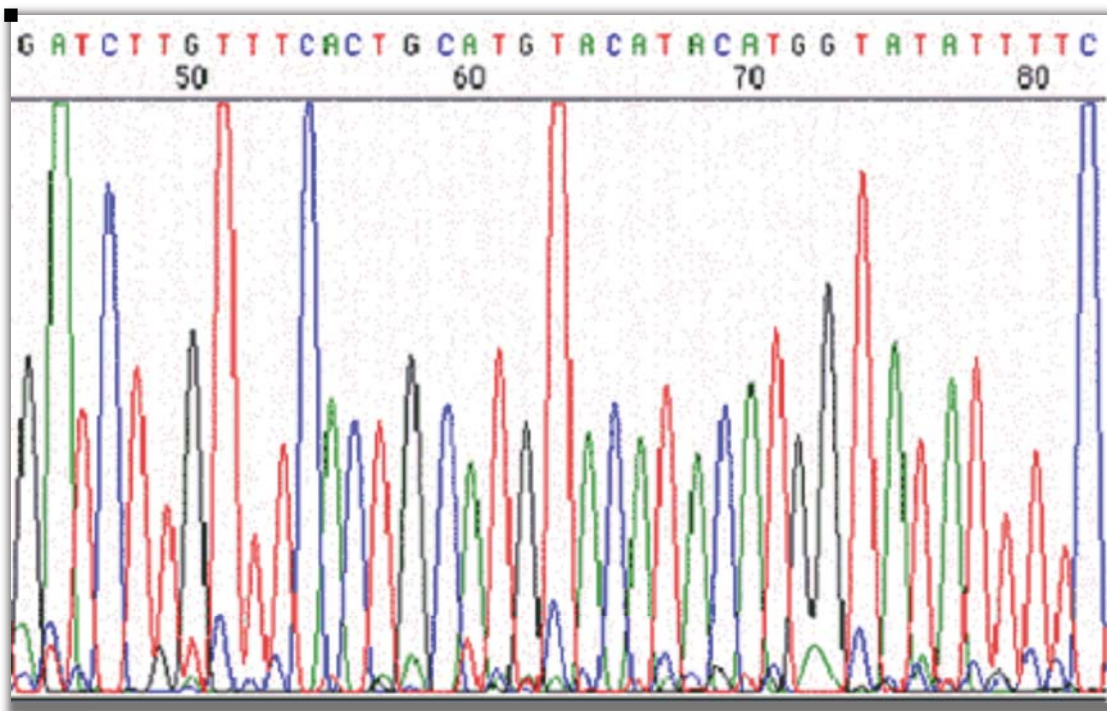


Figura 9 Secuenciación de amplificadores de los genes ITS obtenido por PCR del aislado clínico fúngico

11.3 FORMACIÓN DE BIOFILM EN PLACA

11.3.1 Analisis cuantitativo del biofilm

Se observaron las placas teñidas con cristal violeta a las 72 horas de formación valorando que no hubiese contaminación de las muestras y tomando fotografías del desarrollo de los microorganismos. En el inóculo por *F. solani* se observó un crecimiento asincrónico de las conidias. Las principales características del biofilm fúngico fueron observados durante la etapa de maduración donde se observaba una abundante producción de matriz extracelular, fusión de las hifas (anastomosis) y la formación de canales aéreos entre la red micelial. (Figura 11)

En el inóculo de *S. aureus* se observó formación de colonias bien delimitadas con abundante producción de matriz extracelular. (Figura 12)

En el inóculo mixto se observó modificación de las células fúngicas respecto a la infección individual. La cantidad de conidios se redujo importantemente mientras que la producción bacteriana se concentraba (sin formar microcolonias). Las células fúngicas se observaron más cortas y de hifas más delgadas (abortivas) y estaban inmersas en matriz extracelular. Las bacterias se observaron dispersas formando matrices con secreción anormal y evidente división celular. (Figura 13)

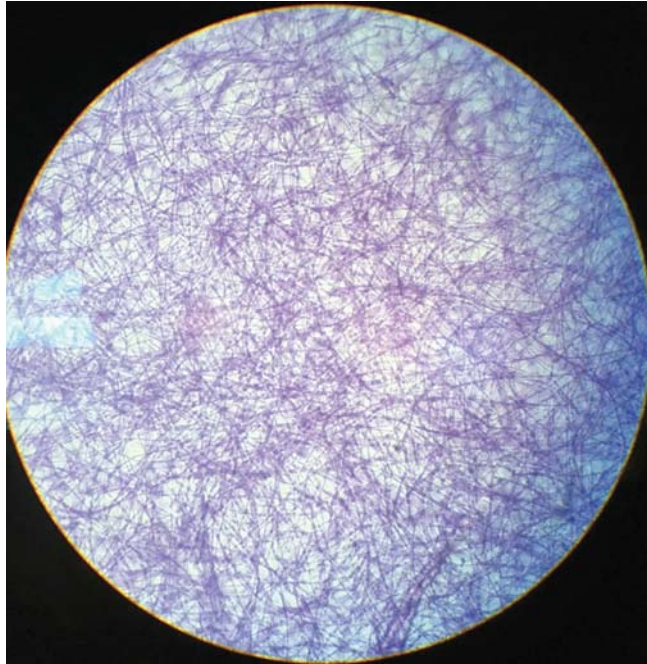


Figura 11. Micrografía de campo claro en la que se observa cultivo de *Fusarium solani* teñido con cristal violeta a 72 horas (10x)

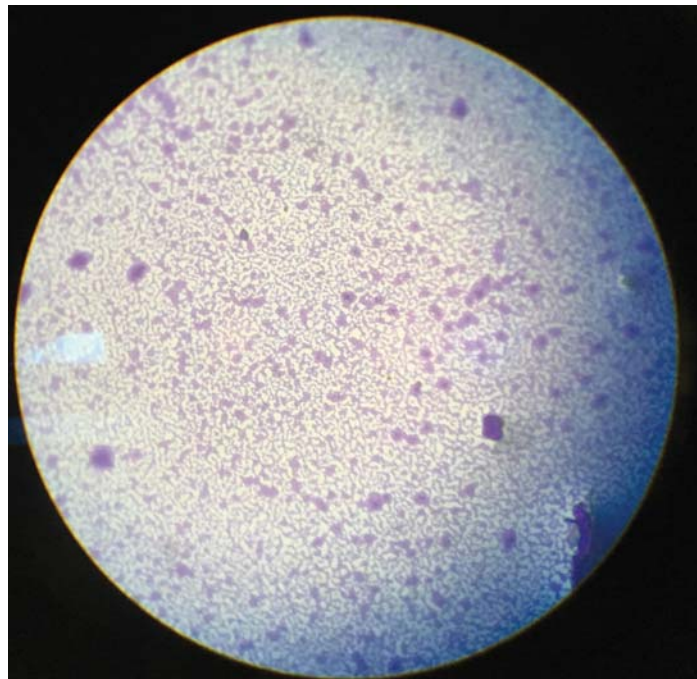


Figura 12. Micrografía de campo claro en la que se observa cultivo *Staphylococcus aureus* teñido con cristal violeta a 72 horas (10x)

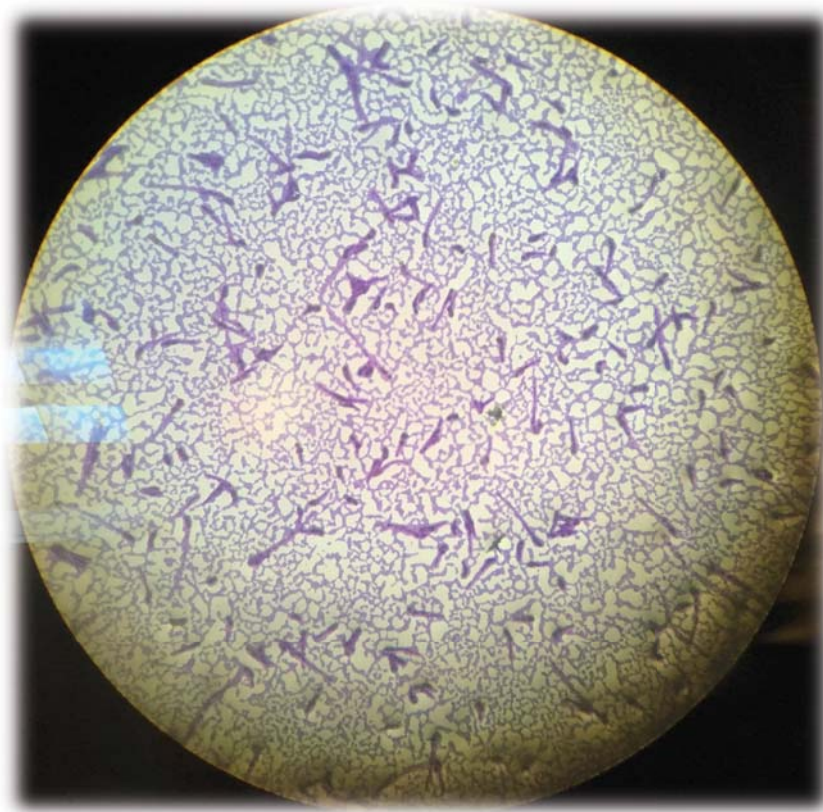


Figura 13. Micrografía de campo claro en la que se observa cultivo de *Fusarium solani* y *Staphylococcus aureus* teñido con cristal violeta a 72 horas (10x).

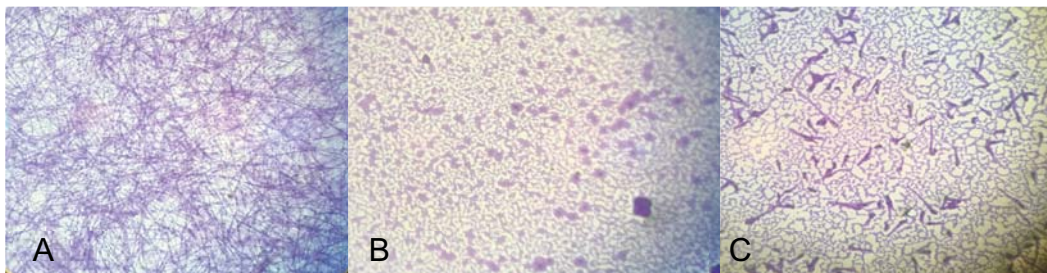


Figura 13 b. Micrografía de campo claro en la que se observa cultivo de *Fusarium solani* (A), *Staphylococcus aureus* (B), y Mixto (C) teñido con cristal violeta a 72 horas (10x).

Se realizó el análisis de absorbancias del biofilm cultivado en placa teñidos con cristal violeta con una dilución 1:5 para no saturar el sistema.

La lectura se realizó a una longitud de onda de 490nm encontrando lo siguiente:

Tabla2. Absorbancia (490nm) del biofilm bacteriano, fúngico y mixto *in vitro*.

| Grupo | Observaciones | Media (nm) | D.E. | Max-Min | |
|------------------|---------------|------------|-------|---------|------|
| <i>F. Solani</i> | 36 | 0.52 | 0.04 | 0.43 | 0.58 |
| <i>S. aureus</i> | 36 | 0.18 | 0.03 | 0.14 | 0.25 |
| Mixto | 36 | 0.39 | 0.03 | 0.29 | 0.53 |
| Control | 36 | 0.08 | 0.003 | 0.07 | 0.08 |

Los resultados fueron analizados empleando ANOVA encontrando una diferencia estadísticamente significativa (<0.05) entre las medias de los grupos comparando con el testigo. Esta fue mayor en el grupo de *F. solani*, seguido por el grupo de infección Mixta y el menor el grupo de *S. aureus*. (Figura 10)

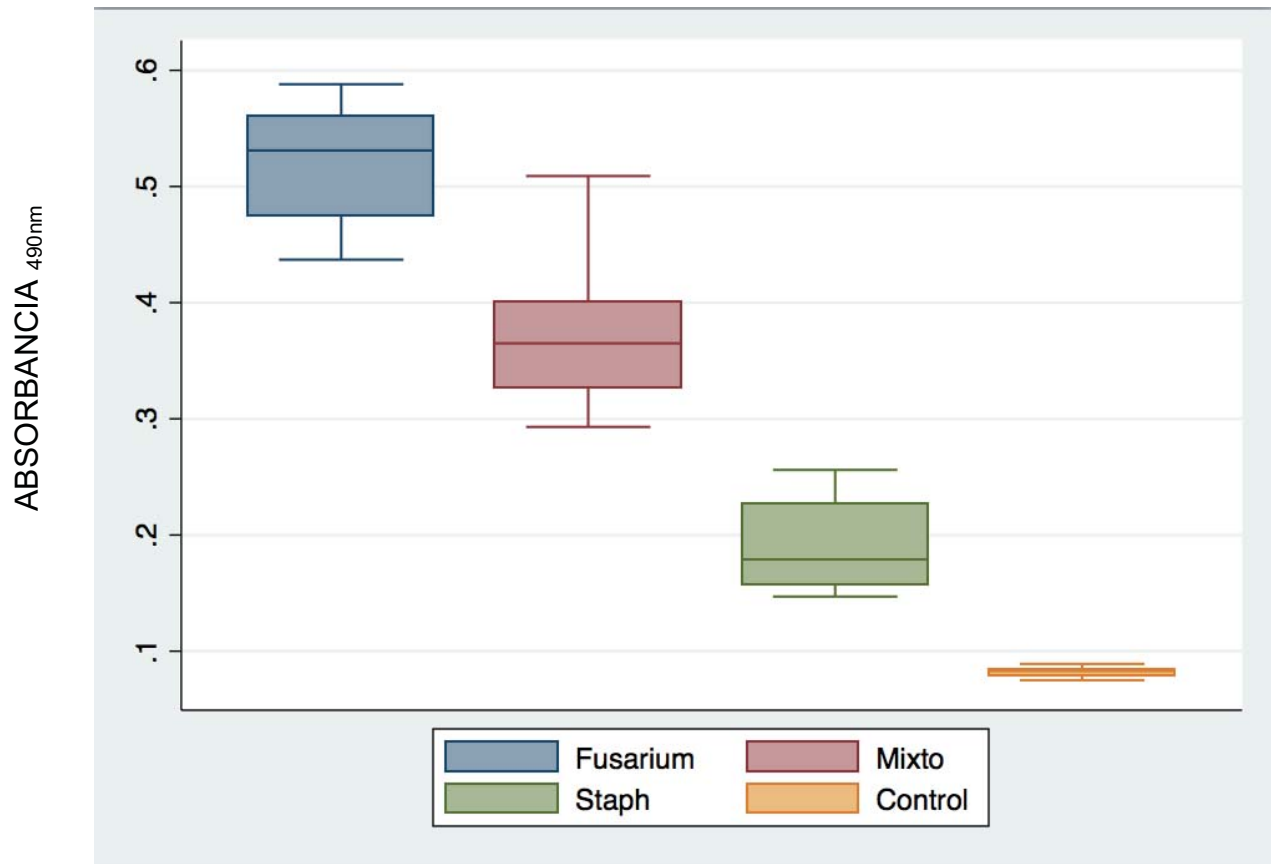


Figura 10 Comparación de las absorbancias promedio de cristal violeta a emisión de 490nm (eje de las Y) de los grupos de estudio (eje de las X) a las 72 horas.

Al analizar los datos por regresión lineal utilizando variables dummies encontramos que hubo una diferencia en las medias al comparara con el grupo control de Abs_{490nm} de 0.4076 para el grupo de infección con *Fusarium*, Abs_{490nm} de 0.0811 para el grupo de infección con *Staphylococcus aureus* y Abs_{490nm} de 0.2909 para el grupo de infección mixta. Los 3 grupos con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

11.3.2 Análisis de biofilm *in vitro* por microscopia de fluorescencia *in vitro*

Para analizar la composición y estructura de la biofilm desarrollada *in vitro* se utilizaron los siguientes fluorocromos: Blanco de calcofluor que muestra emisión en el espectro de luz azul (quitina – carbohidratos), yoduro de propidio muestra emisión en el espectro de luz rojo (ácidos nucleicos) y Flamingos (Proteínas) que muestra emisión en el espectro de luz verde.

La co-localización de los polisacaridos fue revelada por el solapamiento de las señales emitidas por los fluorocromos cuando se unen a manosa/glucosa y DNA. Estas imágenes fueron encontradas en ambos biofilms individuales.

En las imágenes de biofilm bacteriano se observa un condensado intercelular de bordes irregulares en donde los cocos están embebidos. Los hallazgos antes descritos sugieren una producción de matriz extracelular por cada microorganismo (Figura 14). En la reconstrucción tridimensional se observa que dentro de los conglomerados celulares se aprecia en la zona central e inferior emisión con yoduro de propidio, una segunda región que rodea a la primera presenta con emisión de calcofluor y una tercera más externa con emisión de flamingos. (Figura 15)

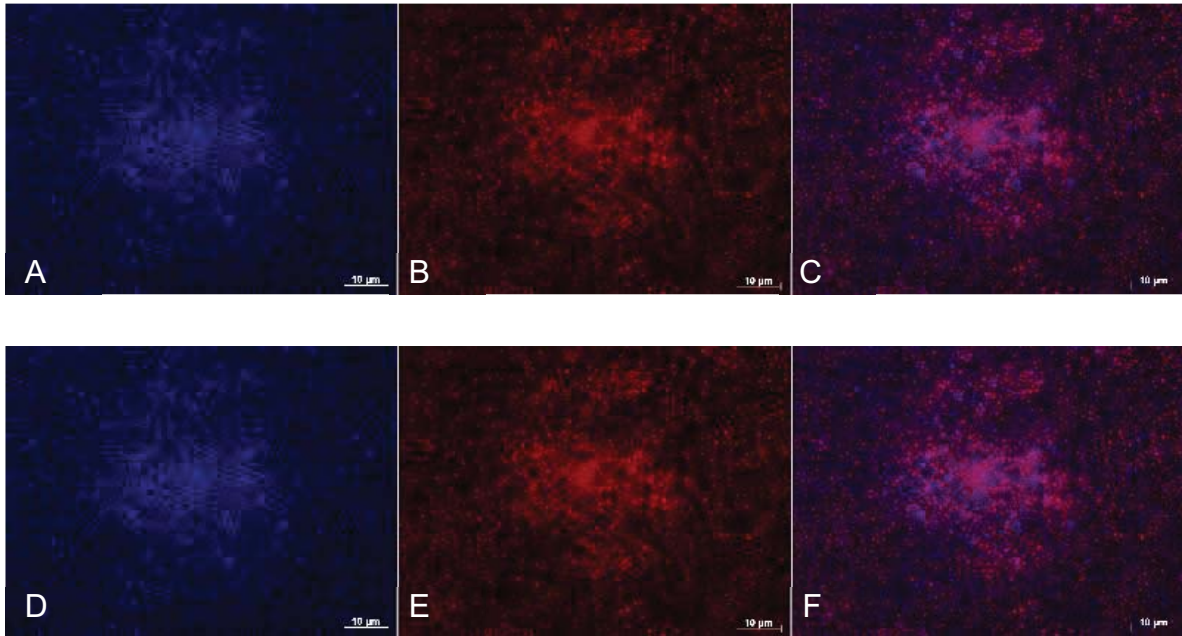


Figura 14. Micrografía de fluorescencia de cultivo *Staphylococcus aureus* a 72 horas. A 63X teñido con blanco de calcofluor, B 63X teñido con Yoduro de propidio, C 63X Combinación Calcofluor y Yoduro de propidio. D 100X teñido con blanco de clacofluor, E 100X teñido con Yoduro de propidio y F 100X Combinación Calcofluor y Yoduro de propidio.

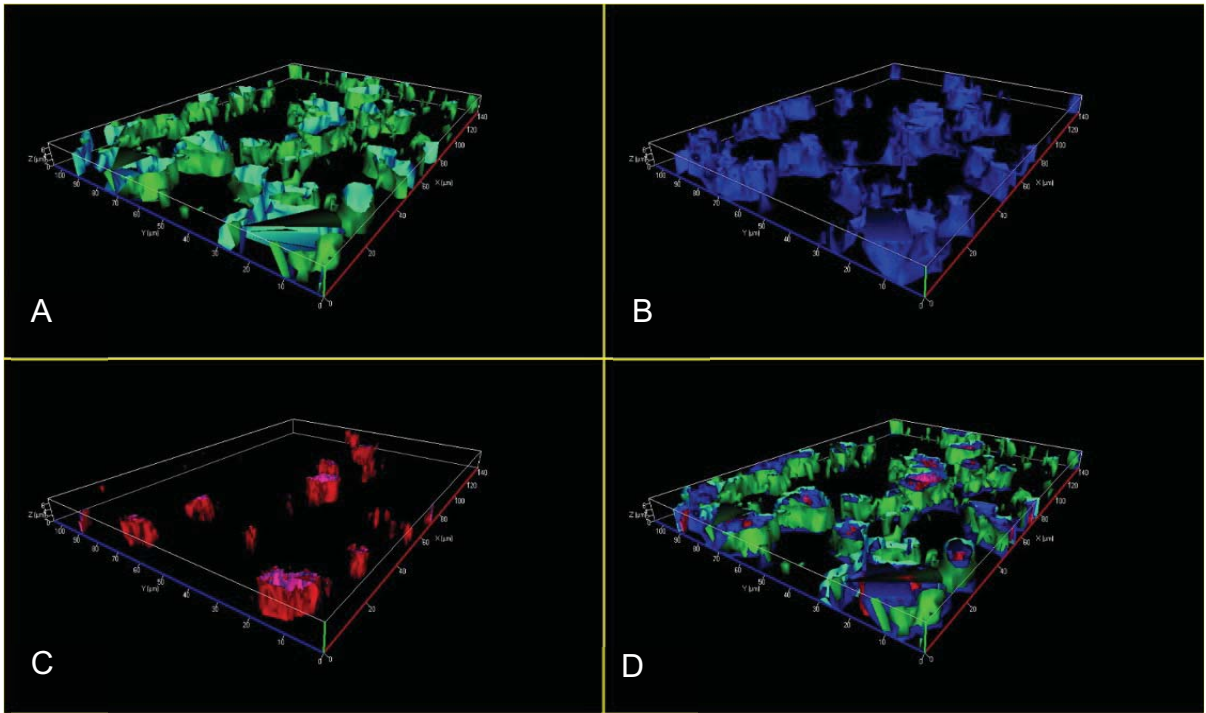


Figura 15. Micrografía de fluorescencia de cultivo *Staphylococcus aureus* a 72 horas. Reconstrucción tridimensional. A 63X teñido con blanco de Flamingos, B 63X teñido con Calcofluor, C 63X teñido con Yoduro de propidio. D 63X Combinación

En *F.solani* la formación de material mucoide fue observada alrededor de las hifas detectadas únicamente con yoduro de propidio, sugiriendo que la matriz extracelular también contiene ácidos nucleicos. En el caso de *F. solani* no se observa tinción de yoduro de propidio interna lo que habla de integridad de las paredes del hongo. (Figuras 16). En la reconstrucción tridimensional se observa intensa emisión de yoduro de propidio dentro de las hifas, entre las hifas se observa un conglomerado en el que se fusionan las emisiones de calcofluor y flamingos y rodeando a las hifas en la pared celular hay emisión por calcofluor (Figura 17)

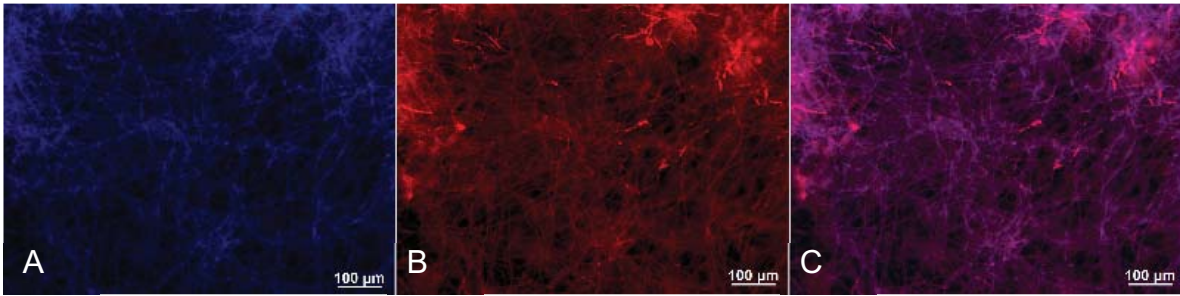


Figura 16. Micrografía de fluorescencia de cultivo *Fusarium solani* a 72 horas. A 10X teñido con blanco de calcofluor, B10X teñido con Yoduro de propidio, C 10X Combinación Calcofluor y Yoduro de propidio.

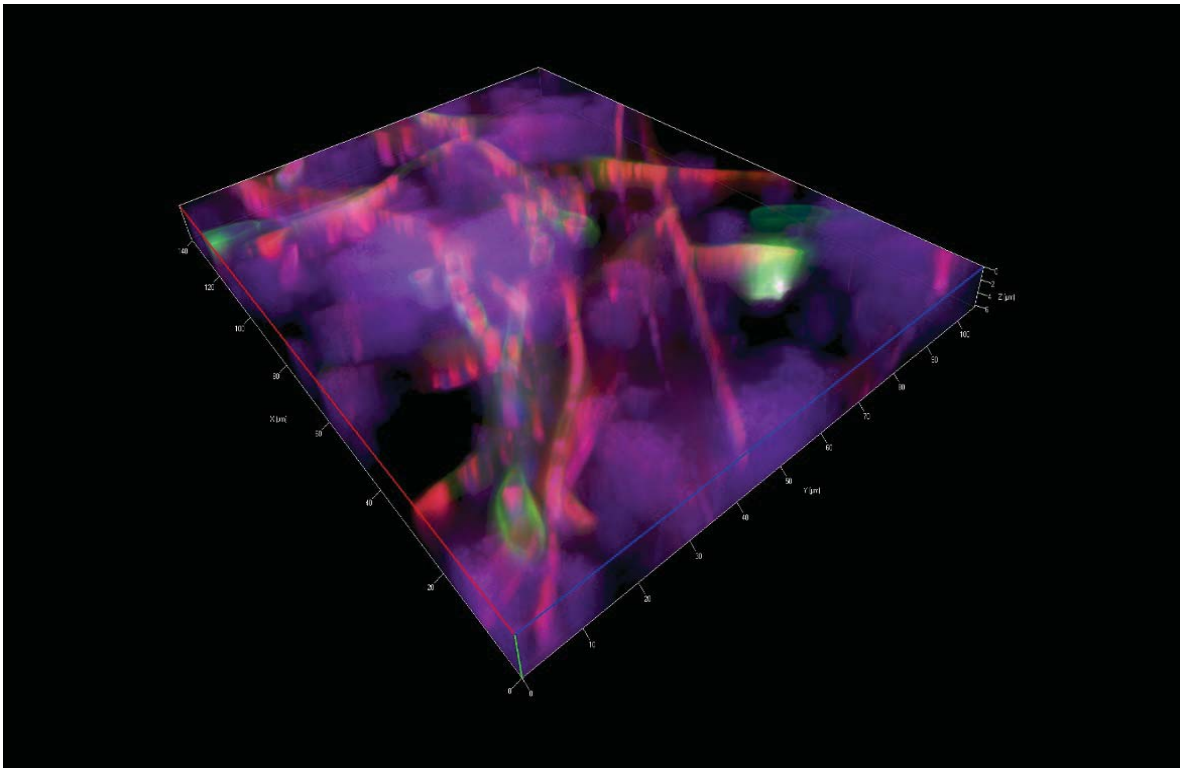


Figura 17. Reconstrucción tridimensional de la fluorescencia del cultivo de *Fusarium solani* a 72 horas. Combinación de tinción de blanco de calcofluor, Yoduro de propidio, y Flamingos.

En el biofilm mixto de *F. solani* y *S aureus* la fluorescencia fue más grande en las hifas en proceso de apoptosis, a diferencia de la biofilm generada por *F solani* las hifas tiñen con yoduro de propidio en el interior, lo que permite inferir de que existe permeabilidad de la pared. También se observan vacuolas dentro de las hifas con contenido predominantemente proteico concordante con el estado de apoptosis. En el biofilm mixto las hifas anormales estaban rodeadas de una gran población de bacterias indicando la coexistencia de quitina y DNA (Figura 18 y 19). Al igual que en los biofilm individuales, en la reconstrucción tridimensional se observa al interior del complejo biofilm tinción por yoduro de propidio y en la periferia emisión por calcofluor. (Figura 19)

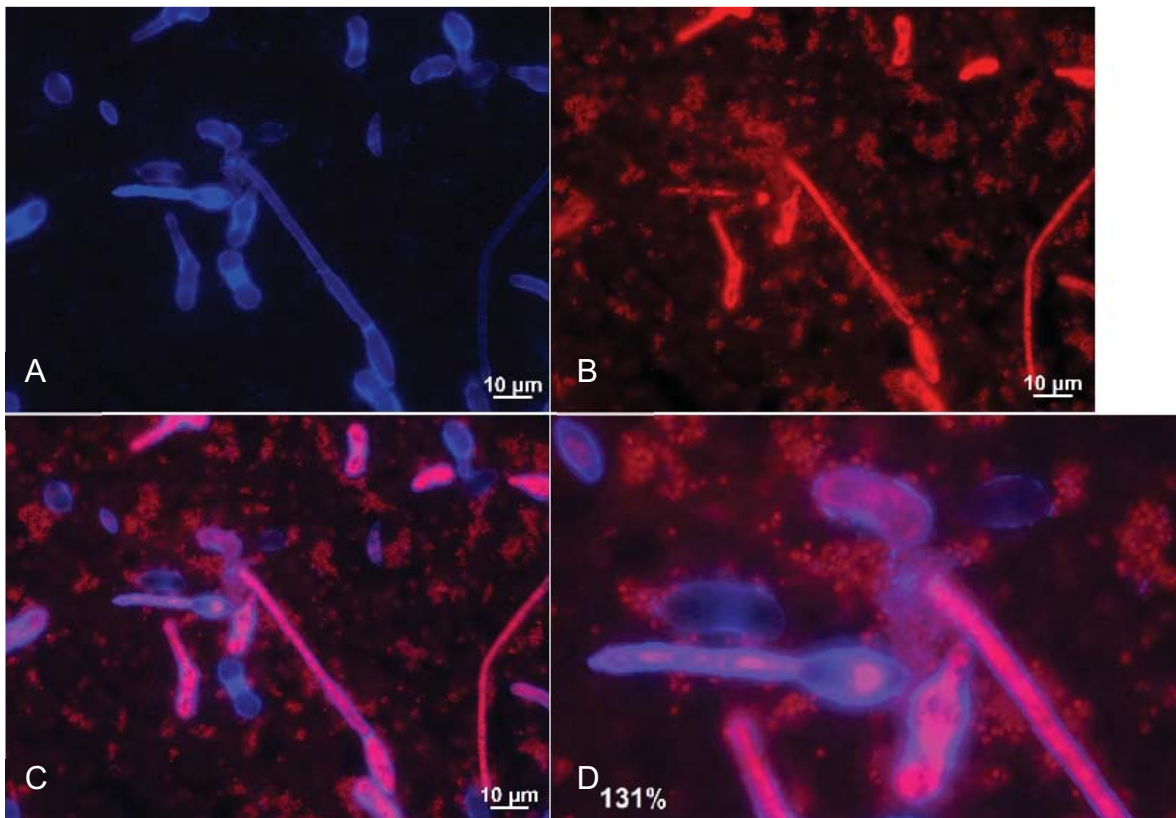


Figura 18. Micrografía de fluorescencia de cultivo *Fusarium solani* y *Staphylococcus aureus* a 72 horas. A 63X teñido con blanco de calcofluor, B 63X teñido con Yoduro de propidio, C 63X Combinación Calcofluor y Yoduro de propidio, D Imagen C con magnificación a 131%.

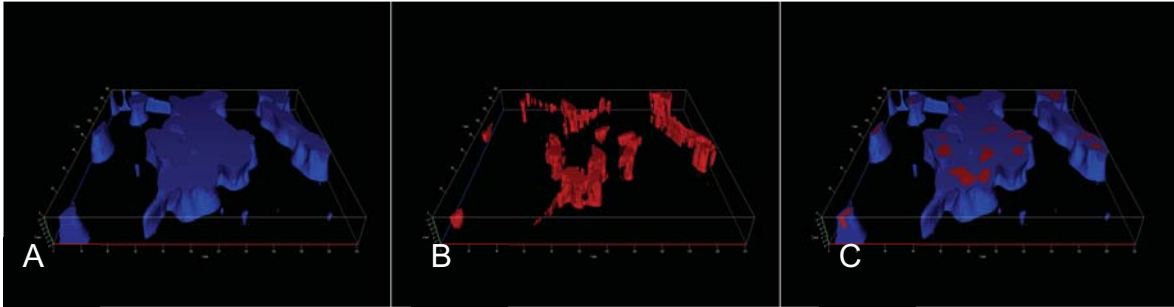


Figura 19. Reconstrucción tridimensional de fluorescencia de cultivo *Fusarium solani* y *Staphylococcus aureus* a 72 horas. A 63X teñido con blanco de calcofluor, B 63X teñido con Yoduro de propidio, C 63X Combinación.

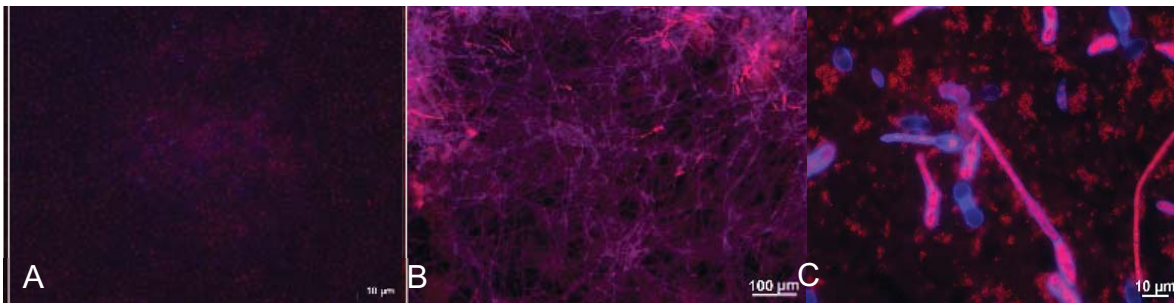


Figura 20. Micrografía de fluorescencia de cultivo de *Staphylococcus aureus* (A), *Fusarium solani* (B) y *Staphylococcus aureus* + *Fusarium solani* (C) a 72 horas. A 63X combinación de blanco de calcofluor e yoduro de propidio.

11.4 FORMACIÓN DEL BIOFILM *IN VIVO*

11.4.1 Análisis clínico de la queratitis

La córnea control mostró un epitelio integro, persistencia de la transparencia sin infiltración leucocitaria ni tampoco datos de vascularización superficial aun en el sitio de la incisión quirúrgica (Figura 21)

A 72 horas de infección, las córneas con inóculo mostraron un defecto epitelial de bordes irregulares en tamaños variables y asociado a una opacidad subyacente por infiltrado leucocitario. Como datos indirectos de inflamación pudimos observar

lisis corneal en el lecho de la úlcera y vascularización superficial centripeta desde el limbo esclerocorneal. El grupo que mostró mayores datos de inflamación corneal clínica fue el inoculado con *F. solani* + *S. aureus* seguido del grupo con inoculación con *F. solani* y finalmente el *S. aureus* (Figuras 21-24)

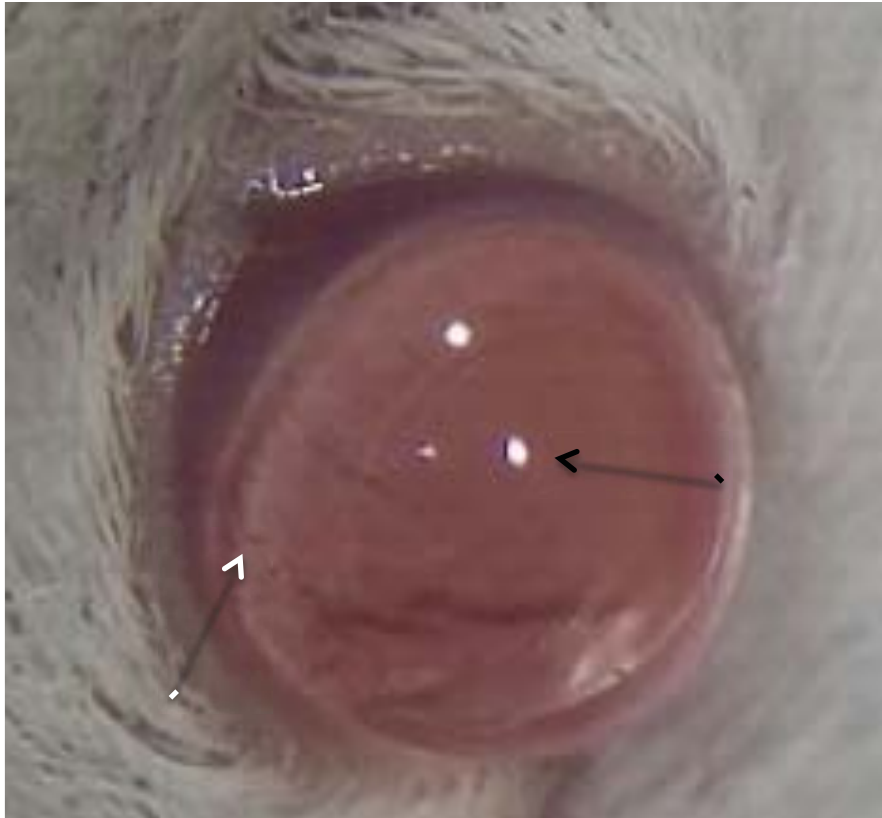


Figura 21. Fotografía clínica de la córnea del ojo derecho de ratón control. Epitelio íntegro (flecha negra), ausencia de secreción, lisis o vasos de reparación patológicos se aprecian vasos iridianos (flecha blanca)

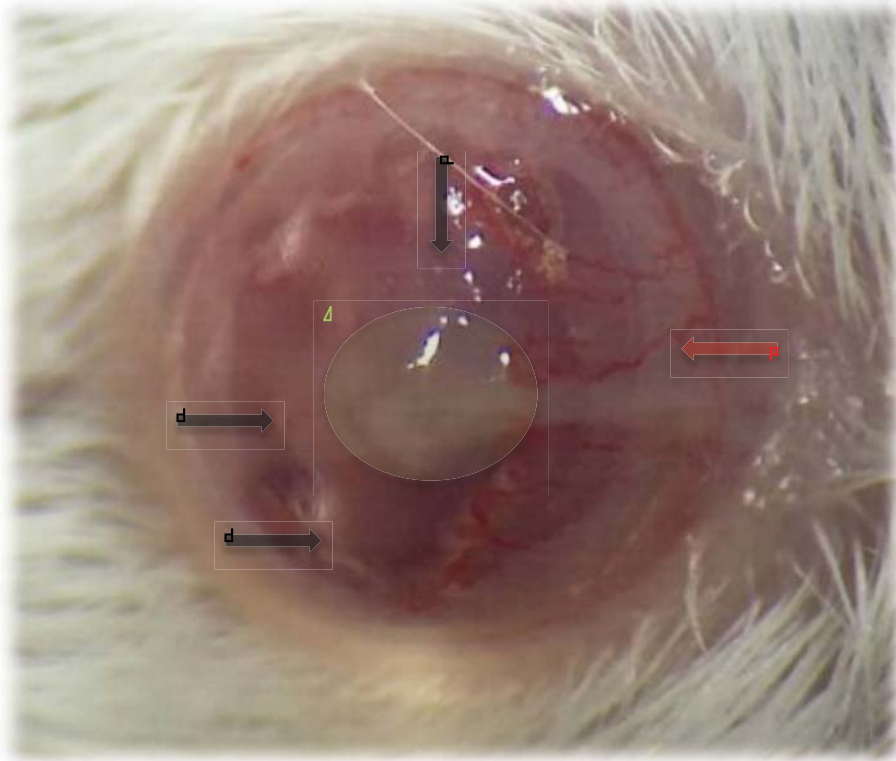


Figura 22. Fotografía clínica de la córnea del ojo derecho de ratón inoculado con *F. solani* a 72 horas de la infección. El halo verde muestra el defecto epitelial, la flecha negra el infiltrado inflamatorio y la flecha roja muestra la vascularización.

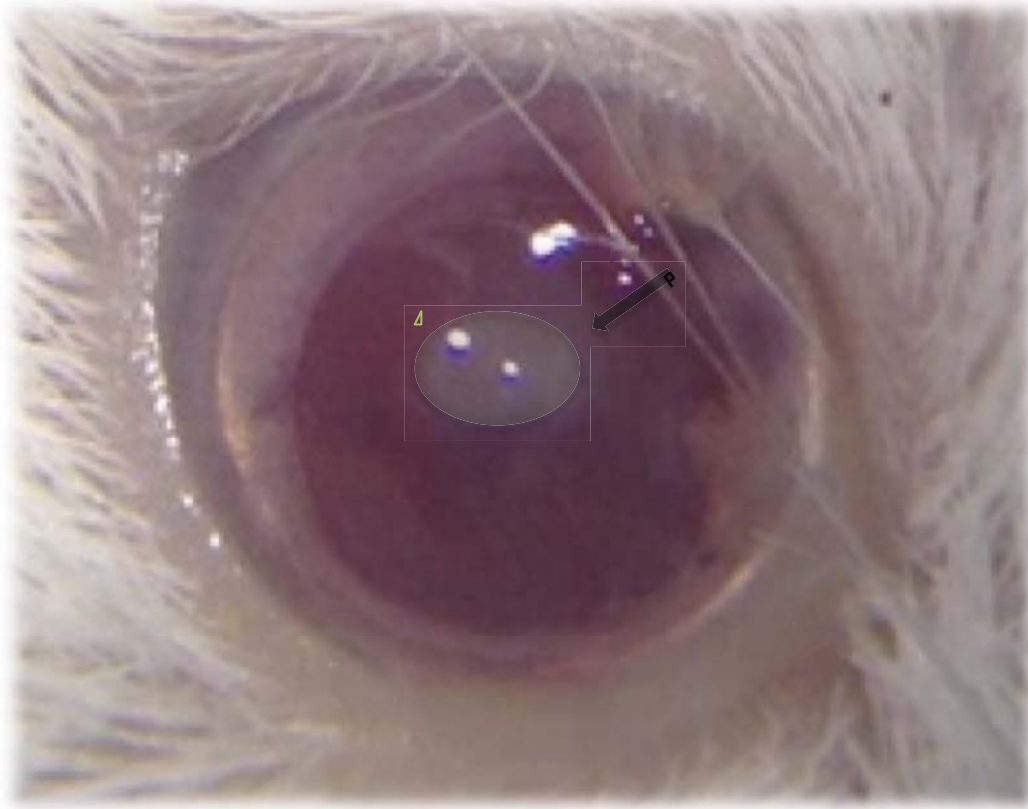


Figura 23. Fotografía clínica de la córnea del ojo derecho de ratón inoculado con *S. aureus* a 72 horas de la infección. El halo verde muestra el defecto epitelial y la flecha negra el infiltrado

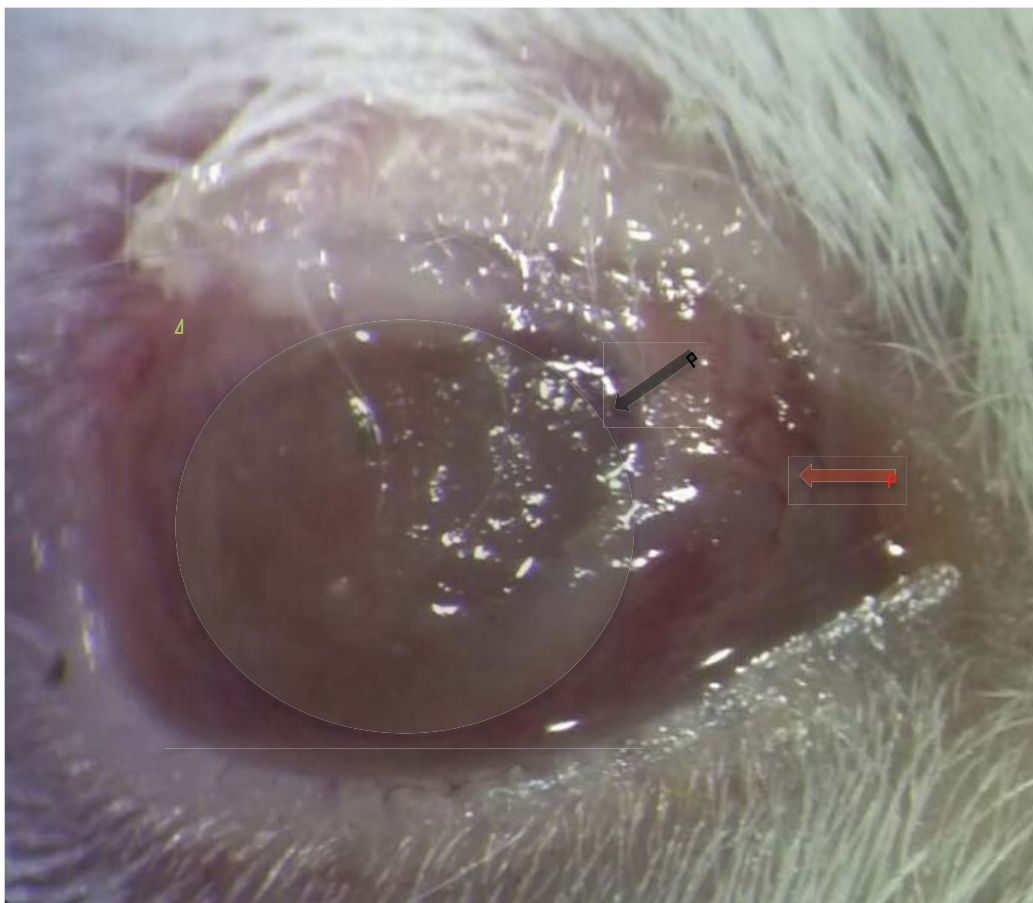


Figura 24. Fotografía clínica de la córnea del ojo derecho de ratón inoculado con *F. solani* y *S. aureus* a 72 horas de la infección. El halo verde muestra el defecto epitelial, la flecha negra el infiltrado inflamatorio y la flecha roja muestra la vascularización.

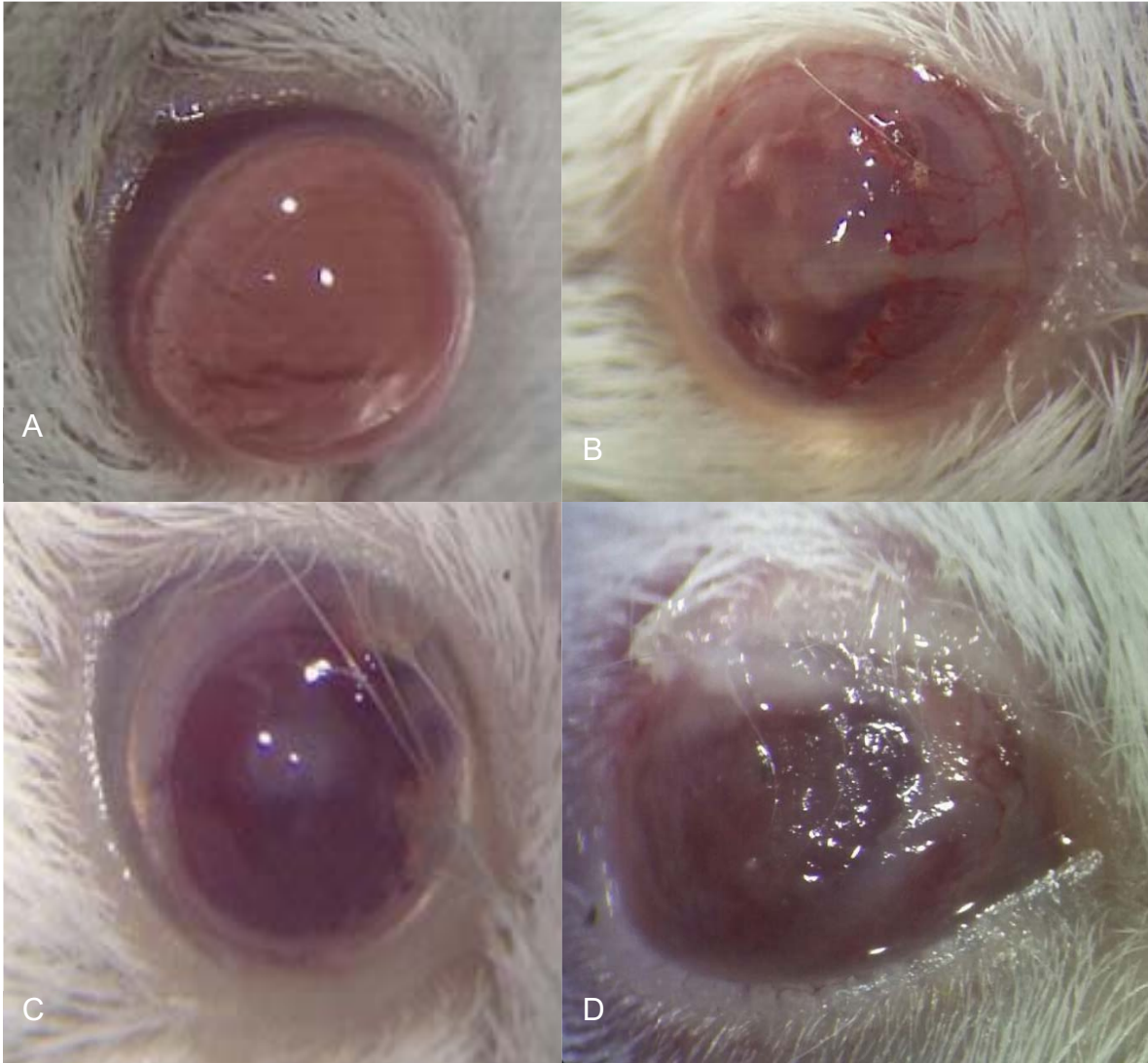


Figura 24 B. Imagen comparativa de fotografías clínica de la córnea del ojo derecho de ratón control (A), inoculado con *F. solani* (B), *S. aureus* (C) e infección mixta por *F. Solani* + *S. aureus* a 72 horas de la infección.

Tabla 3. Tabla resumiendo las estadísticas descriptivas de las características clínicas de las úlceras en los diferentes sujetos. * medias con intervalos de confianza al 95% y desviación estándar.

| Grupo | Tamaño (mm)* | Infiltrado (mm)* | Relación infiltrado/úlceras | Lisis | Vascularización |
|------------------|------------------|------------------|--------------------------------|-------|-----------------|
| <i>F. Solani</i> | 0.89 (0.81-0.96) | 1.01 (0.94-1.07) | 1.14 | 1 | 10 |
| <i>N=10</i> | DE 0.03 | DE 0.02 | | | |
| <i>S. aureus</i> | 1.15 (1.03-1.26) | 1.09 (1.02-1.15) | 1.05 | 2 | 5 |
| <i>N=10</i> | DE 0.05 | DE 0.02 | | | |
| Mixto | 1.31 (1.23-1.38) | 1.36 (1.26-1.45) | 0.96 | 4 | 7 |
| <i>N=10</i> | DE 0.03 | DE 0.04 | | | |

En el análisis por grupo encontramos que los sujetos con coinfección presentaron un defecto epitelial mayor (1.31mm) que los inóculos por separado, sin embargo, la relación del infiltrado inflamatorio con el defecto epitelial fue menor (0.963). Contrario a lo sucedido con los grupos de *F. solani* y *S. aureus* por separado, en los cuales la relación del infiltrado inflamatorio fue de 1.14 y 1.05 respectivamente. Al realizar la comparación por ANOVA no hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.263$).

Respecto al porcentaje de ratones que presentaron lisis y vascularización (indicadores indirectos de proceso inflamatorio) observamos que el grupo que presentó más sujetos con lisis fue el Mixto, mientras que el que presentó más sujetos con vascularización fue el *F solani*. (TABLA 3)

11.4.2 Análisis de cortes histológicos.

En la arquitectura corneal del ratón previa a la infección se observó una estructura sana y con una superficie intacta. Las imágenes de microscopía de luz mostraron células epiteliales desplegadas en capas bien definidas y con un estroma compacto sin células inflamatorias, así como, mínimos queratocitos dispersos por el estroma. Se aprecia una capa única de células endoteliales homogéneas posterior al estroma. (Figura 25)

En los tres grupos de infección se observa un cúmulo de microorganismos intraestromales rodeados por matriz extracelular y un gran número de células inflamatorias de predominio polimorfonucleares.

En los cortes histológicos de la queratitis bacteriana el inóculo se encontró limitado a estroma medio y posterior. Las lamelas de colágeno tenían una disposición irregular con aumento del número de queratocitos, fibroblastos y células inflamatorias intraestromales perilesionales. (Figura 26)

En los cortes del grupo de *F. solani*, los microorganismos penetraron el endotelio invadiendo la cámara anterior. A diferencia del grupo de *S. aureus*, la matriz extracelular fue menor pero el infiltrado inflamatorio perilesional más extenso aunque focalizado. La tinción con HE mostró disrupción de la arquitectura del tejido en la córnea infectadas con *Fusarium*, así como un aumento del infiltrado de células inflamatorias (predominio polimorfonucleares), placa retroquerática. Adyacente a las áreas de inflamación se observó necrosis y fibrosis significativa. Un gran número de filamentos fúngicos estuvieron presentes invadiendo cada una de las capas de la córnea, incluso atravesando el endotelio hasta llegar a la cámara anterior (Figura 27).

En el grupo de la coinfección se observó que el inóculo se distribuyó de manera más difusa, menos profunda (estroma medio y anterior) y la solución de continuidad del epitelio es más grande que en las queratitis de un solo agente etiológico. La matriz extracelular y el infiltrado es más extenso. (Figura 28)



Figura 25. Micrografía campo claro 20X tinción de H-E de córnea de ojo control 72 horas del inóculo, la toma muestra la zona en donde se hizo la incisión quirúrgica. La flecha negra señala el epitelio corneal, la flecha azul señala el estroma y la flecha verde el endotelio.

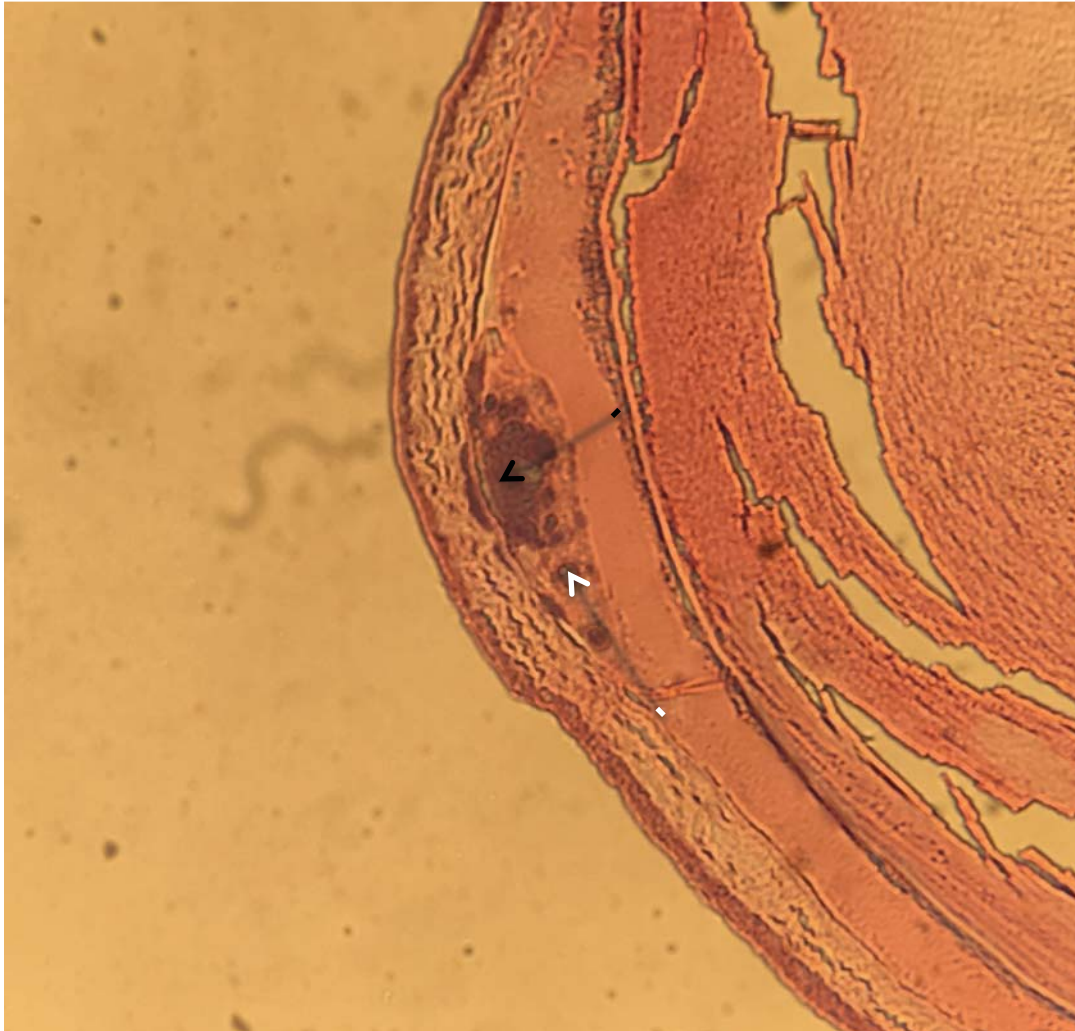


Figura 26. Micrografía campo claro 20X tinción de H-E de córnea infectada con *S. aureus* a 72 horas del inóculo, la flecha negra indica el conglomerado de *S. aureus* y la flecha blanca el infiltrado leucocitario.



Figura 27. Micrografía campo claro 10X tinción de H-E de córnea infectada con *F. solani* a 72 horas del inóculo, la flecha negra indica el sitio de infección y la flecha blanca el sitio donde el inóculo penetra a cámara anterior.

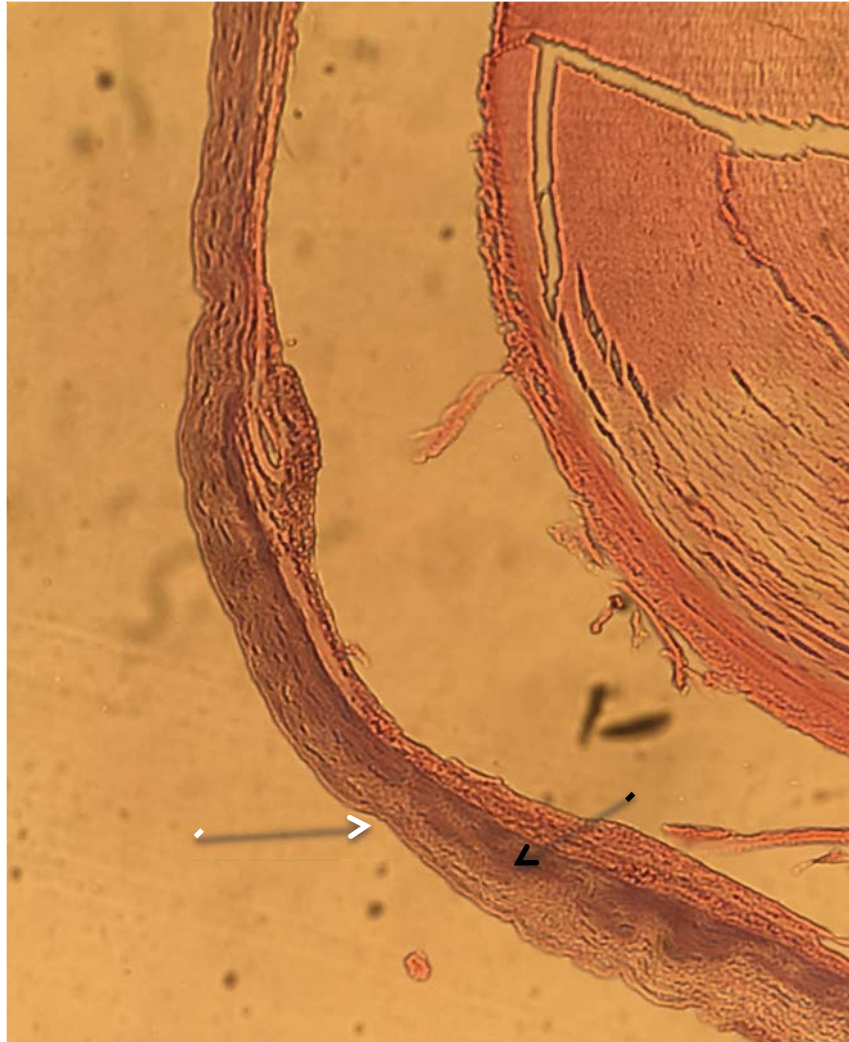


Figura 28. Micrografía campo claro 10X tinción de H-E de córnea infectada con *F. solani* y *S. aureus* a 72 horas del inóculo, , la flecha negra indica el sitio de infección e infiltrado inflamatorio. La flecha blanca señala el sitio donde debiera estar el epitelio corneal.

11.4.3 Análisis histológicos con fluorocromos

Cuando se observó la córnea control teñida con los fluorocromos encontramos los núcleos de las células epiteliales y endoteliales con el yoduro de propidio. Con flamingos una tinción de predominio en membranas basales y uniones de las lamelas de colágena y con calcofluor poca tinción en las membranas de las células de epitelio y estroma. En el estroma las lamelas de colágena se muestran con una distribución ordenada y con escaso contenido celular por lo que prácticamente no hay presencia de núcleos u otro material fuera de la colágena. Únicamente se observa un aumento de la fluorescencia en el área de fibrosis relacionada a la lesión quirúrgica (pocket o cartera). (Figura 29)

En los cortes de la córnea con infección por *Staphylococcus aureus* se observó: a) pérdida de la estructura del epitelio, b) estroma con una organización aberrante en sus lamelas de colágena con abundantes conglomerados de bacterias en todos sus estratos, c) abundante tinción de núcleos con yoduro de propidio (particularmente en el área de agrupación de *Staphylococcus*) y en la periferia es donde hay una mayor emisión con Calcofluor y Flamingos, lo que nos habla de que la mayor parte de la matriz extracelular se encuentra rodeando el conglomerado bacteriano no dentro de él. Además, se vieron abundantes células inflamatorias de la infiltración particularmente polimorfonucleares. (Figura 30)

En las micrografías de los ojos con infección por *Fusarium solani* se encontró: a) pérdida del epitelio, b) desorganización de las lamelas de colágena y c) hifas teñidas con yoduro de propidio dispersas por todo el estroma, no tan agrupadas como en el caso de las bacterias. Además se observó una emisión de calcofluor y de flamingos entre las estructuras microbianas. La localización de las hifas de fusarium se disponían en su mayoría en el estroma medio y se dirigían al estroma posterior. La infiltración leucocitaria fue más difusa comparada a lo observado en la infección por solo *Staphylococcus*. (Figura 31 y 32)

En las córneas con infección mixta hubo también pérdida de epitelio y alteración de las fibras de colágena, pero la extensión de los microorganismos fue más difusa. Las hifas se encontraron rodeadas de bacterias las cuales no se

encuentran tan estrechamente agrupadas como cuando se inoculan solas. Las hifas se observaron más cortas y con una localización más anterior. Al igual que en el modelo in vitro, el interior de las hifas tiñe con yoduro de propidio, lo cual tradujo daño o permeabilidad de la pared del hongo. Los núcleos de los microorganismos fueron teñidos por yoduro de propidio y entre las estructuras celulares se captó emisión por calcofluor y flamingos lo cual apoyó la presencia de una matriz extracelular compuesta de carbohidrato y proteínas entre los bordes de los microorganismos. De igual forma el infiltrado de células inflamatorias se observó difuso por todo el estroma. (Figura 33 y 34)

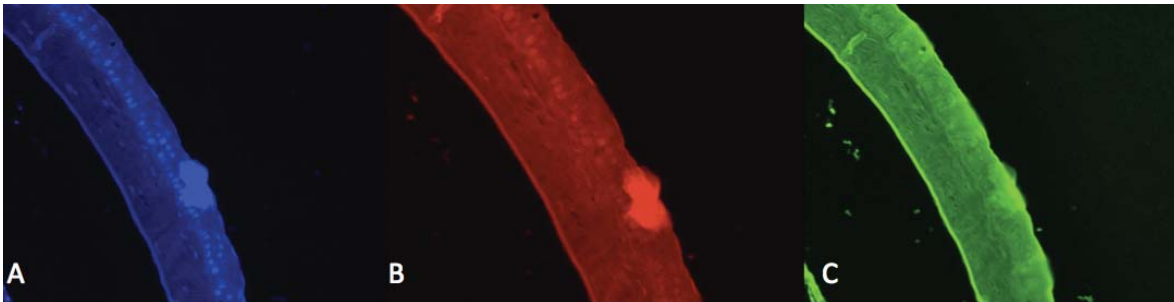


Figura 29. Micrografía de fluorescencia 10X de cornea control, A) tinción con calcofluor, B) Tinción con yoduro de propidio, C) Tinción con Flamingos

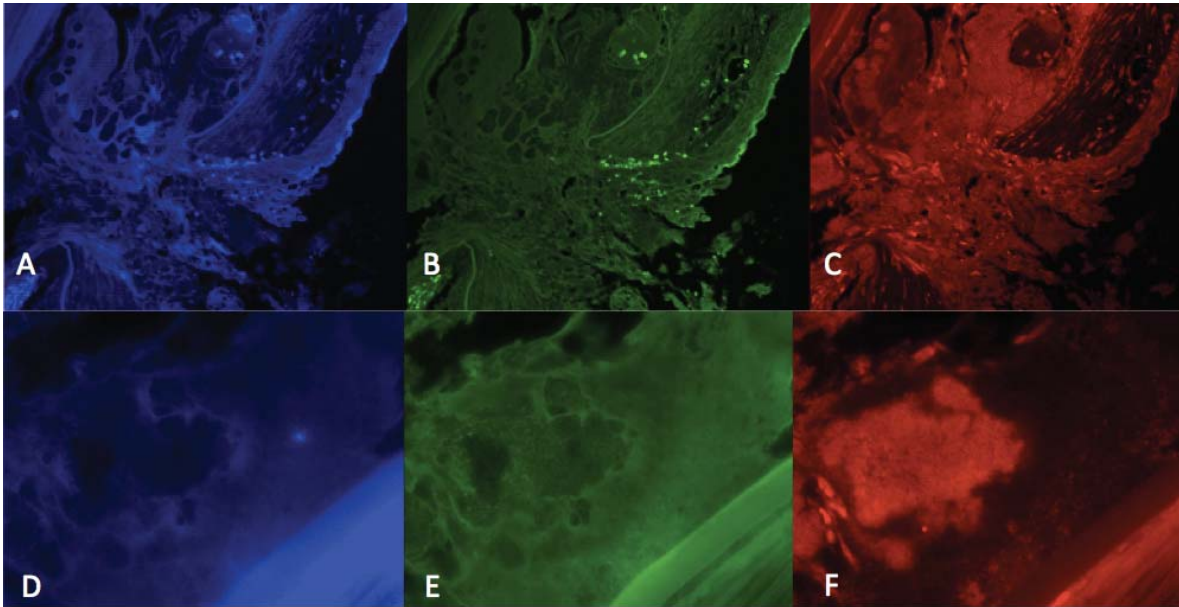


Figura 30. Micrografía de fluorescencia de córnea inoculada con *Staphylococcus aureus*, A tinción con calcofluor a 20X, B. Tinción con Flamingos a 20X, C Tinción con yoduro de propidio a 20X, D tinción con calcofluor a 63X, E. Tinción con Flamingos a 63X, F Tinción con yoduro de propidio a 63X

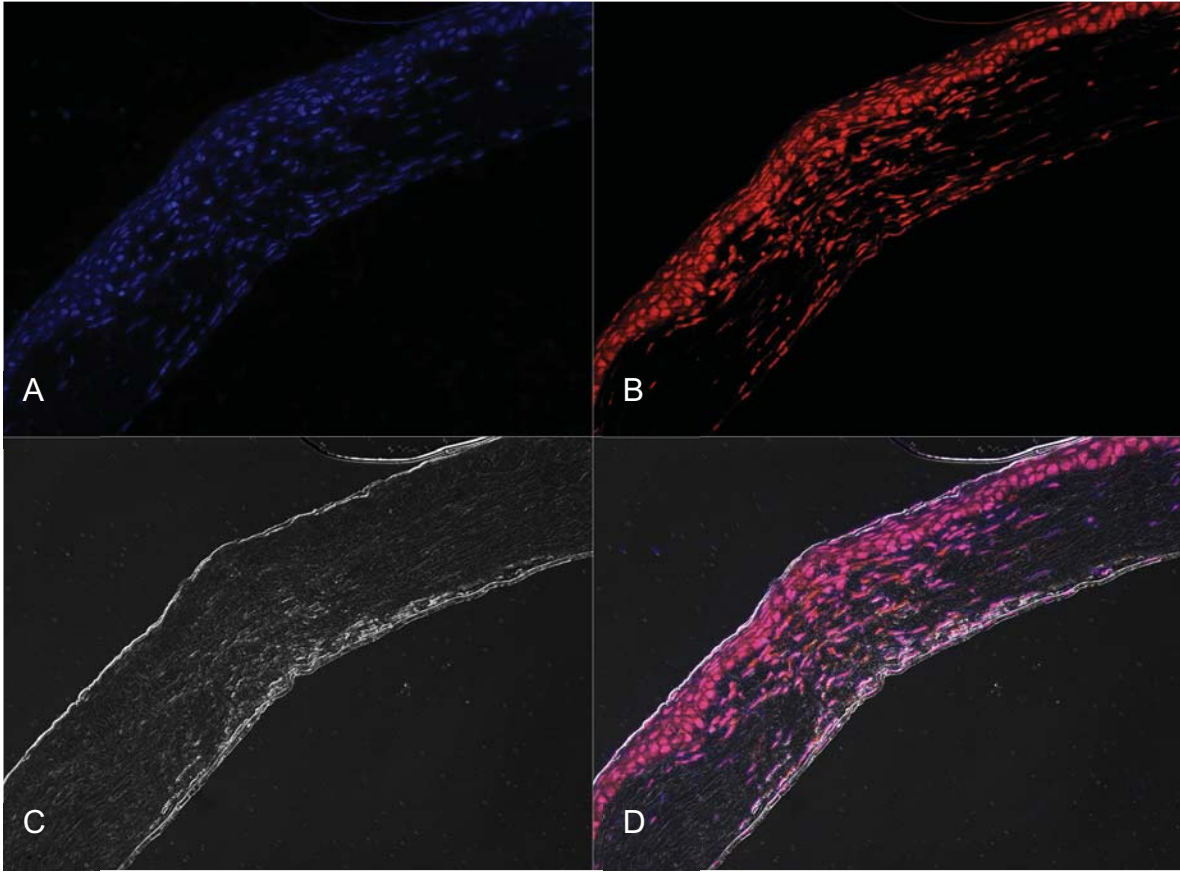


Figura 31. Micrografía de fluorescencia 10X de queratitis por *Fusarium solani*, A tinción con calcofluor, B. Tinción con yoduro de propidio, C tinción con Flamingos y D Combinación

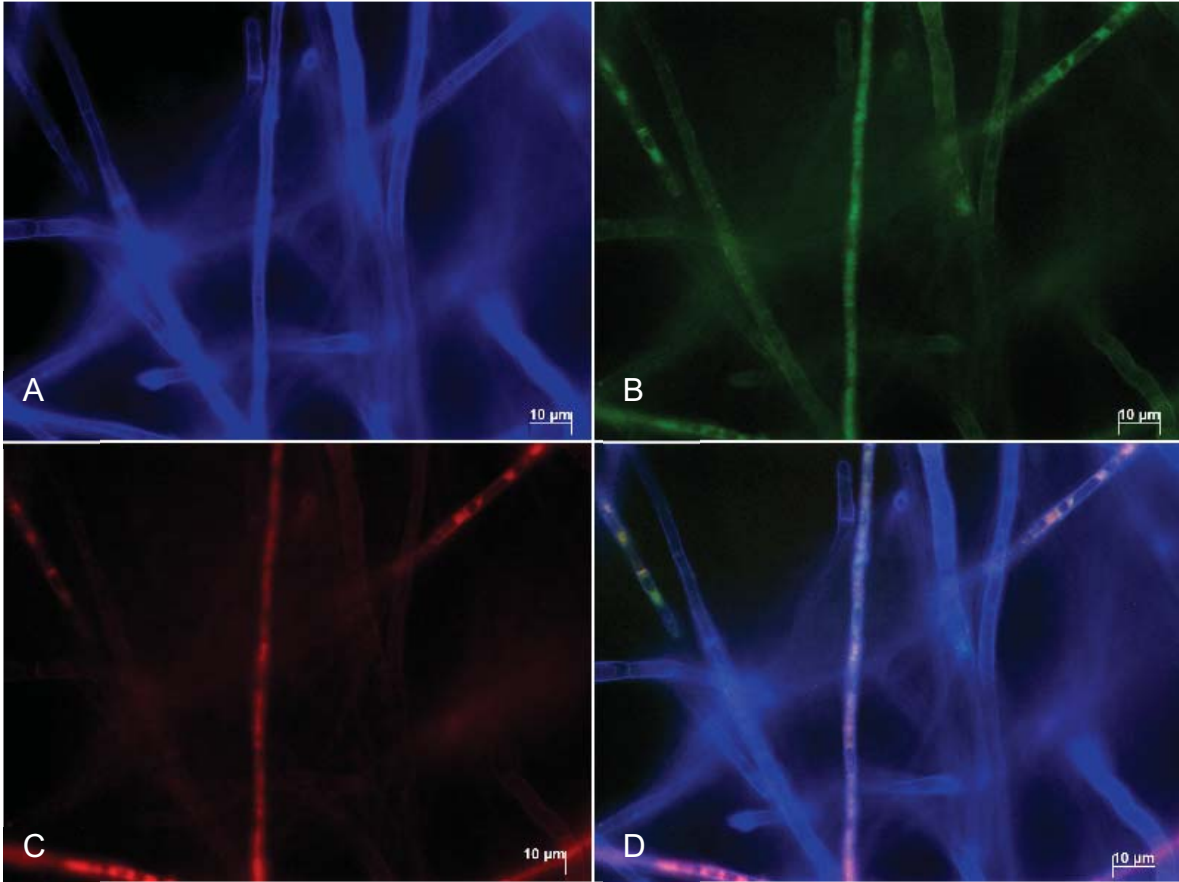


Figura 32. Micrografía de fluorescencia de córnea inoculada con *Fusarium solani* a 72 horas. A 63X teñido con blanco de calcofluor, B 63X teñido con Flamingos, C 63X teñido con Yoduro de propidio, D 63X Combinación Calcofluor, Flamingos y Yoduro de propidio.

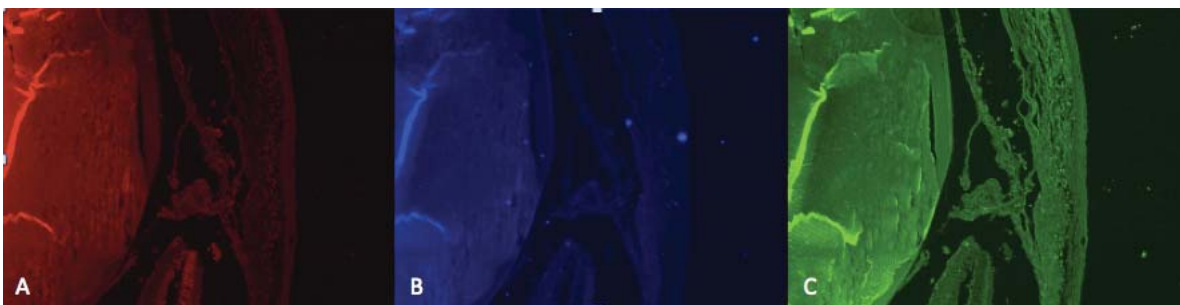


Figura 33. Micrografía de fluorescencia 10X de córnea con queratitis mixta, A tinción con yoduro de propidio, B. Tinción con calcofluor, C Tinción con Flamingos

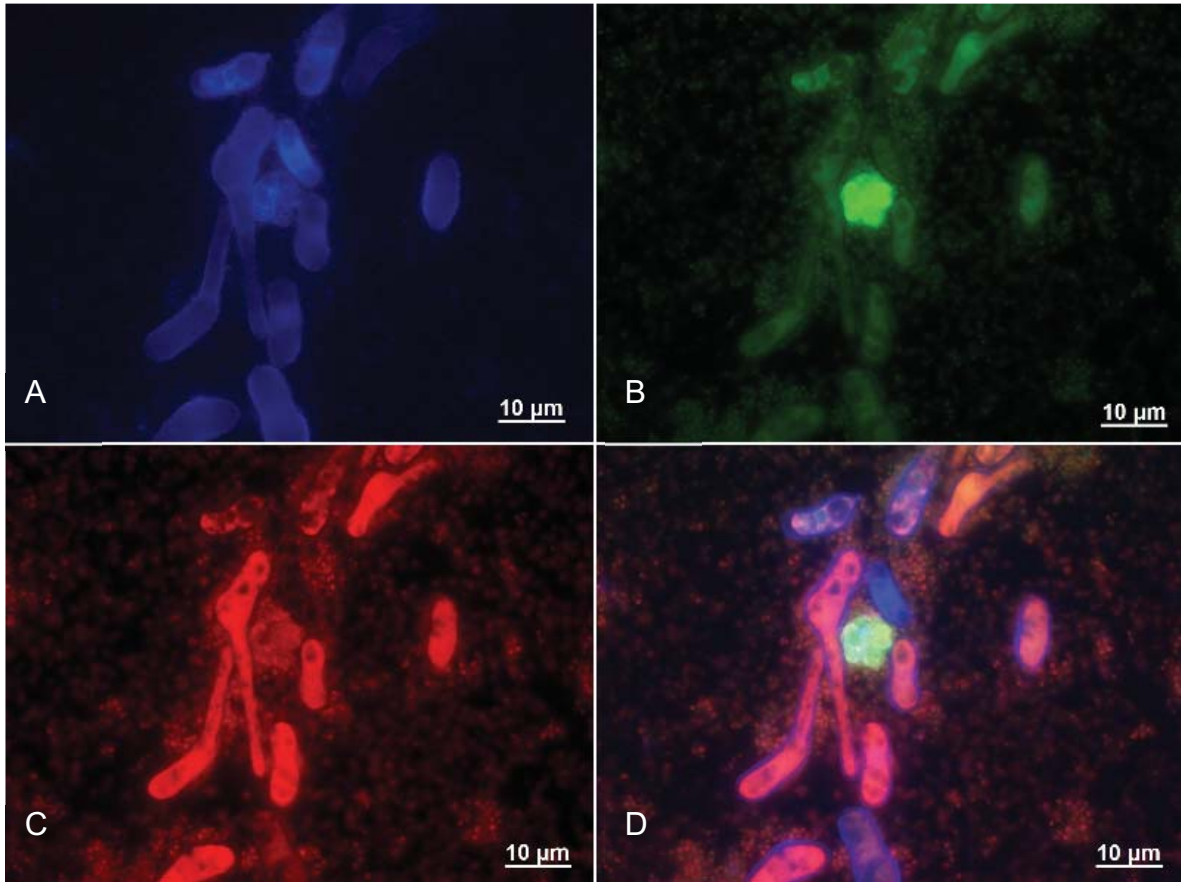


Figura 34. Micrografía de fluorescencia de córnea inoculada con *Fusarium solani* y *Staphylococcus aureus* a 72 horas. A 100X teñido con blanco de calcofluor, B 100X teñido con Flamingos, C 100X teñido con Yoduro de propidio, D 100X Combinación Calcofluor, Flamingos y Yoduro de propidio.

11.4.5 Microscopia electrónica

En la córnea control se observó morfológicamente un epitelio con mayor número de capas estratificadas en la región central y menor en la periferia, sus células epiteliales se observaron adheridas a las células adyacentes y a la membrana basal mediante desmosomas y hemidesmosomas, respectivamente. Debajo del epitelio, las fibras que aparecen como colágena tipo VII en la región de la membrana basal del epitelio, estas difieren en su orientación y compactación respecto a la organización laminar del estroma. El estroma estaba organizado en lamelas, donde la cara anterior no muestran el entrelazado extenso y complejo visto en la córnea humana. En la región posterior se observó una configuración más compleja. En toda la estructura se encontraron queratocitos similares a los de los seres humanos. Se observan Gap junctions entre ellos.

El endotelio del ratón no posee el patrón de división de bandeado presente en la córnea humana, pero tiene una capa anterior delgada adyacente al estroma, la cual podría corresponder a la porción fetal bandeadada en los humanos.

La medida promedio de grosor del endotelio fue de $2.10 \pm 0.4 \mu\text{m}$, este cubre toda la cara posterior de la córnea donde se evidenciaron uniones gap estrechas entre cada una de las células endoteliales. Las uniones entre las células contenían zónula ocludents. (Figuras 35 y 36)

En las imágenes con microscopio electrónico de transmisión de la córnea infectada con *Staphylococcus aureus*, se hallaron estructuras redondas y esféricas hiperdensas con una pared prominente de 1 micrómetro de diámetro dentro de la córnea degenerada (epitelio destruido, lamelas de colágena con distribución aberrante, con infiltración de células inflamatorias particularmente polimorfonucleares y fibroblastos en área estromal). A un mayor aumento de tamaño se observan las estructuras esféricas hiperintensas rodeadas de matriz extracelular con material fibrilar funcionando como puente entre las células bacterianas. Las microcolonias no cubrieron una gran área pero están localizadas en distribución de parches, con células activas embebidas en matriz extracelular.

(Figuras 37 a 40)

En el caso de la queratitis infecciosa por *Fusarium* observada se apreciaron estructuras alargadas tubulares de contenido con densidad mixta e irregular y una pared hipo intensa, éstas se aprecian embebidas en una matriz. La superficie de la córnea mostró una red altamente coordinada de estructuras de hifas entrecruzadas. La matriz extracelular se mostró aparentemente uniéndolas, sin embargo, las hifas estaban embebidas juntas en vez de estar separadas como se observa en biofilm in vitro.

Los canales entre las estructuras de la infección por *Fusarium* no pudieron ser evaluados por lo denso de la matriz extracelular.

En las micrografías electrónicas de las corneas infectadas por *Fusarium* se encontraron las lamelas de colágena con una disposición desordenada y aberrante, sin embargo las células inflamatorias fueron menores así como los fibroblastos con respecto a las infectadas con bacteria. (Figuras 41 – 44)

En cuanto a las corneas infectadas con *Fusarium* y *Staphylococcus* se comprobaron estructuras alargadas de pared prominente interior electrodenso heterogéneo, más cortas que las hifas observadas en el inóculo individual y rodeada por abundantes estructuras esféricas; ambas rodeadas por una matriz extracelular. No hubo presencia de epitelio y el estroma mostró lamelas desorganizadas con abundantes células inflamatorias principalmente polimorfonucleares. (Figura 45 – 48)

Como un hallazgo se encontraron en las corneas con infección mixta cúmulos de células con abundantes gránulos dispersas en todo el estroma corneal, se realizó tinción con azul de toluidina revelando que eran células cebadas y estas se encontraban distribuidas en los bordes de la úlcera. (Figura 49)

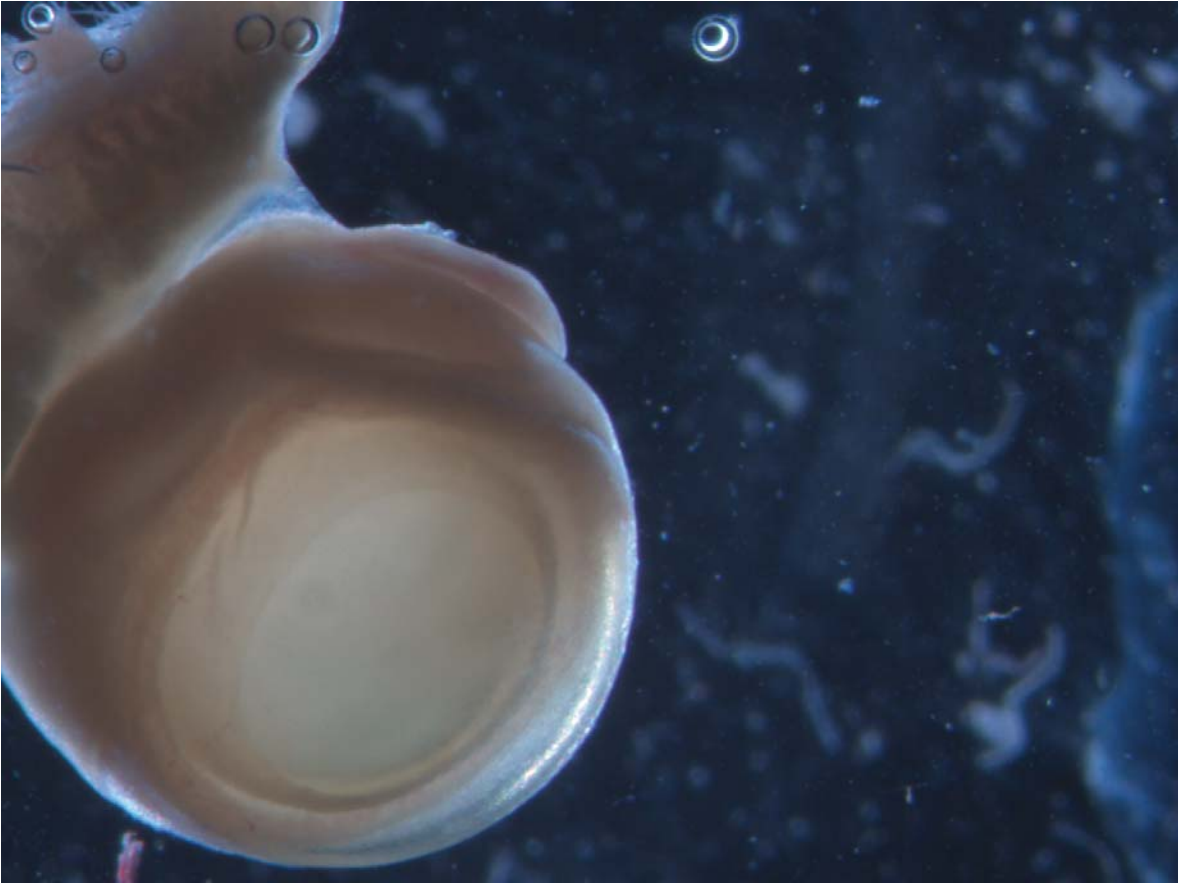


Figura 35. Micrografía con microscopio estereoscópico doble iluminación 10X que muestra ojo control sin alteraciones y de características normales.

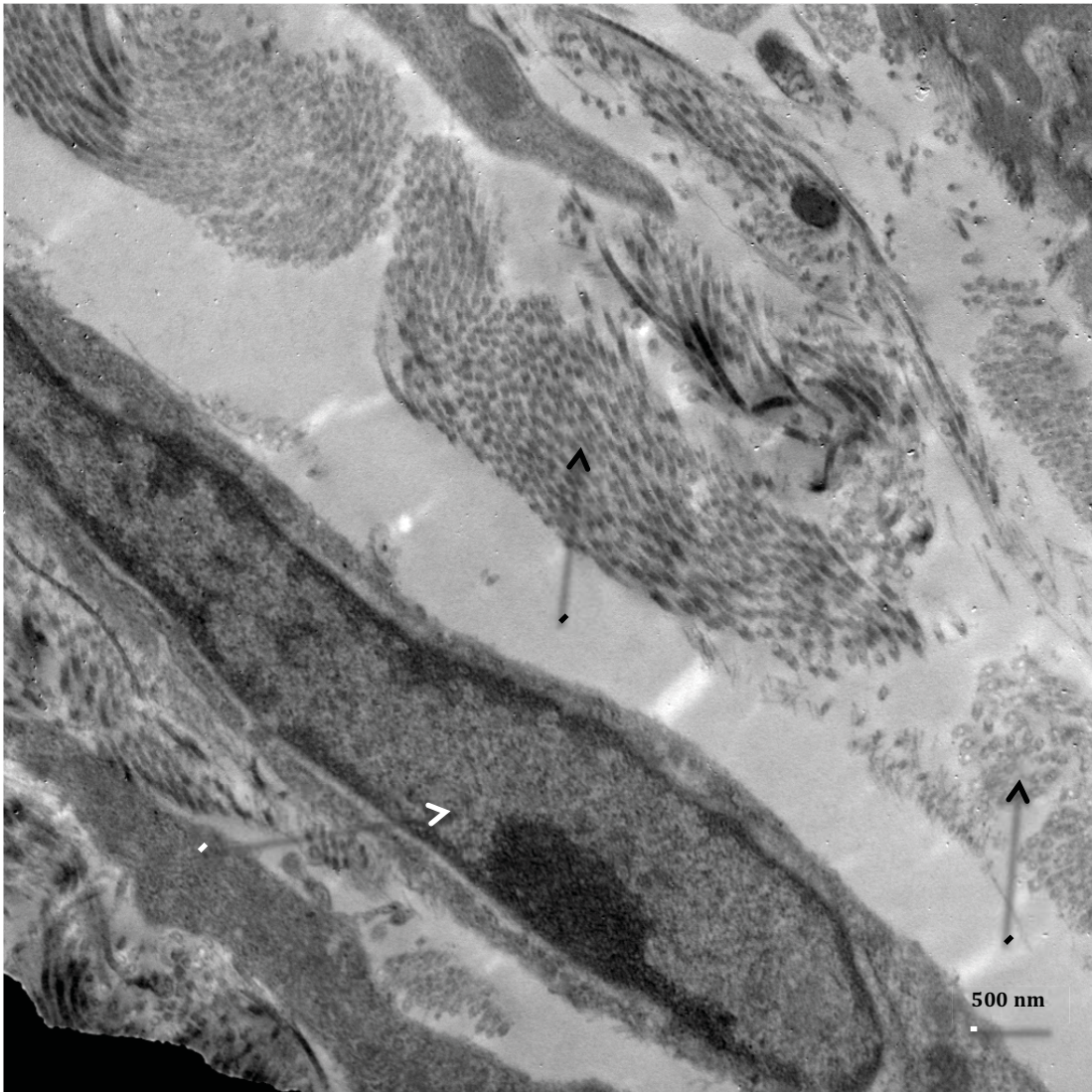


Figura 36. Microscopia electrónica de transmisión 20000X de córnea control enfoque estromal donde se observan lamelas de colágena compactas de distribución organizada (flecha negra). Se observa la presencia de queratocito inmerso en estroma medio. (flecha blanca)

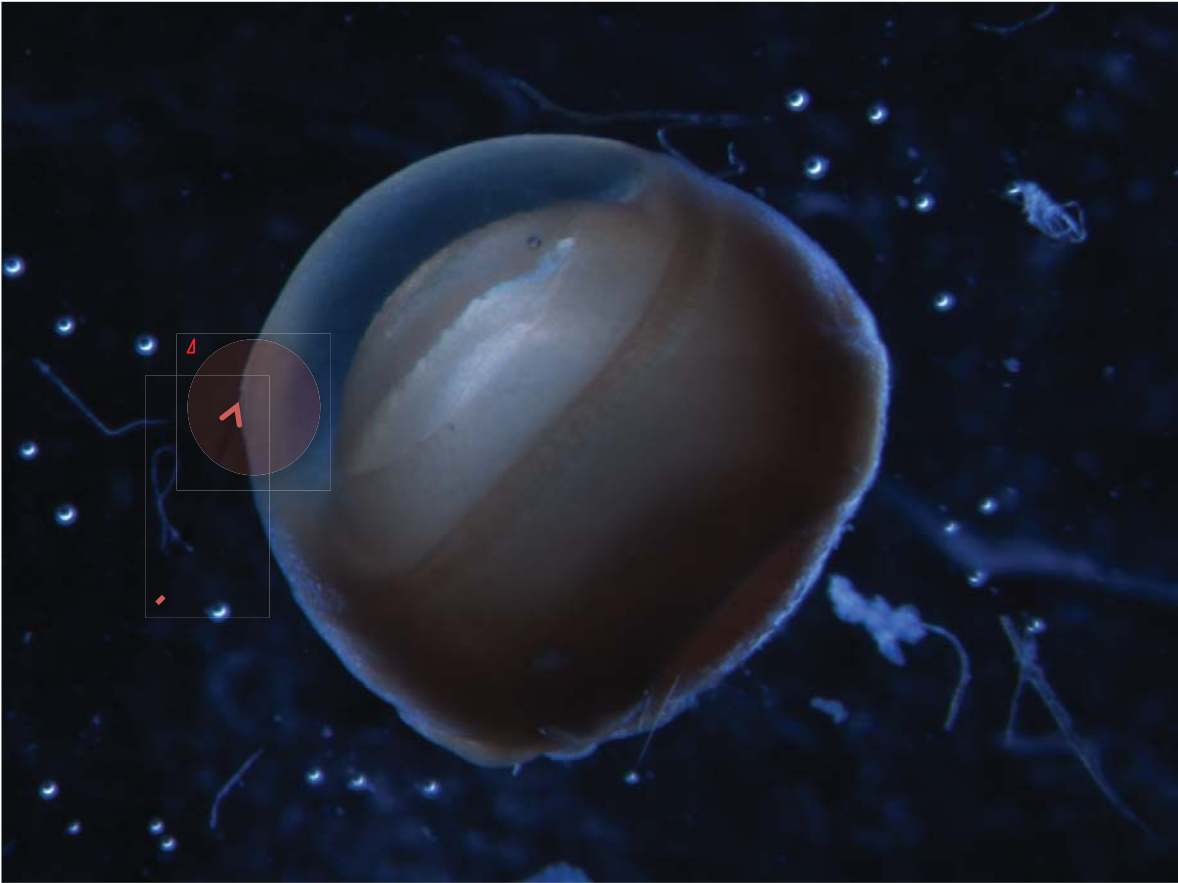


Figura 37. Micrografía con microscopio estereoscópico de doble iluminación 10X que muestra ojo con úlcera por Staphylococcus aureus.

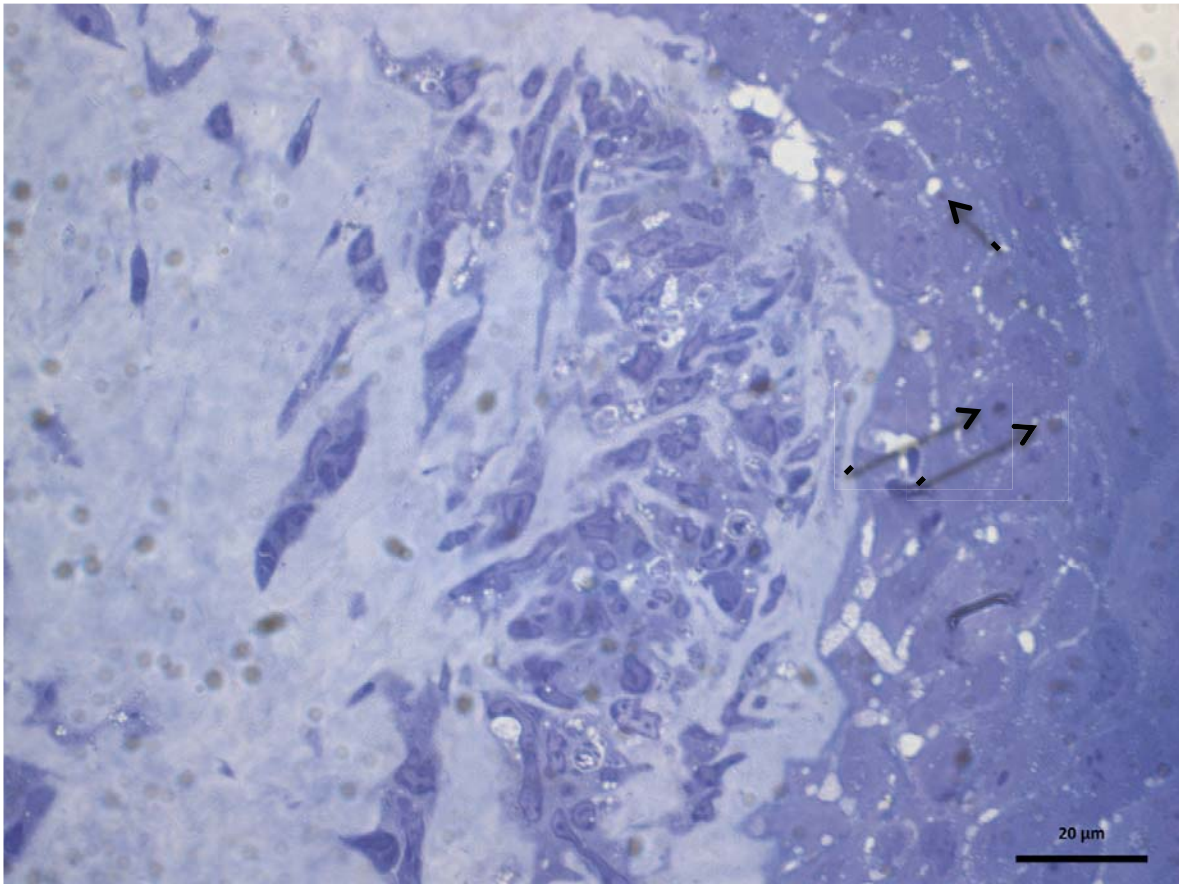


Figura 38. Micrografía de corte semifino teñida con azul de toluidina observada con microscopia óptica de campo claro 100X, estroma se observa infiltración de abundantes células inflamatorias (flecha roja) y presencia de bacterias (flecha negra).

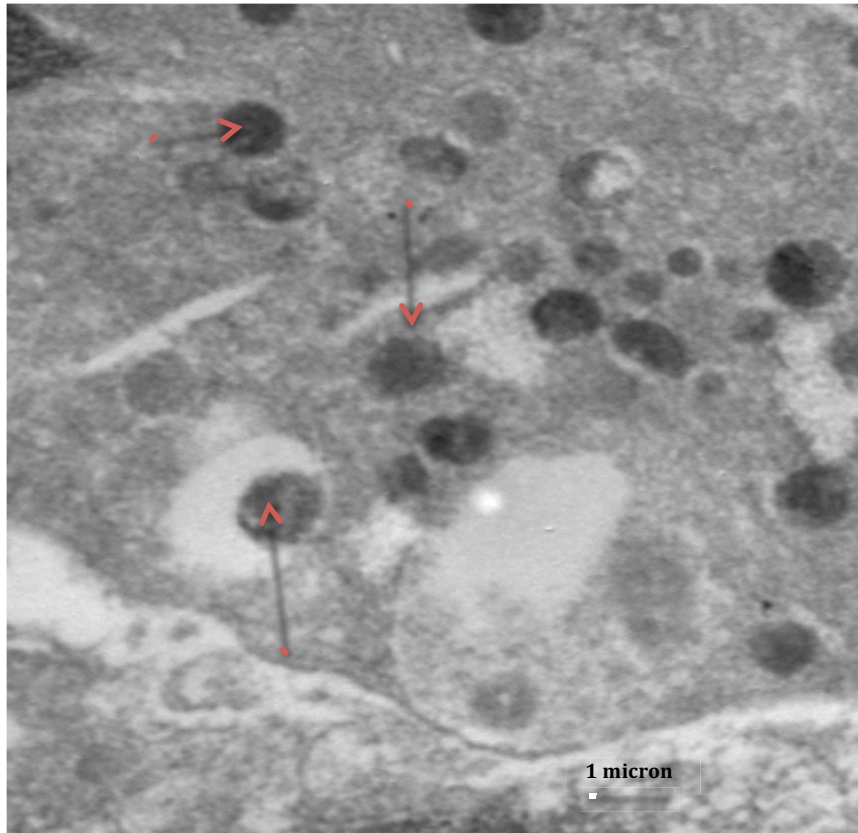


Figura 39. Micrografía de Staphylococcus aureus observado por Microscopía electrónica de transmisión 20000X donde se observan cocos (flecha roja) de pared bien definida asociados por matriz extracelular.

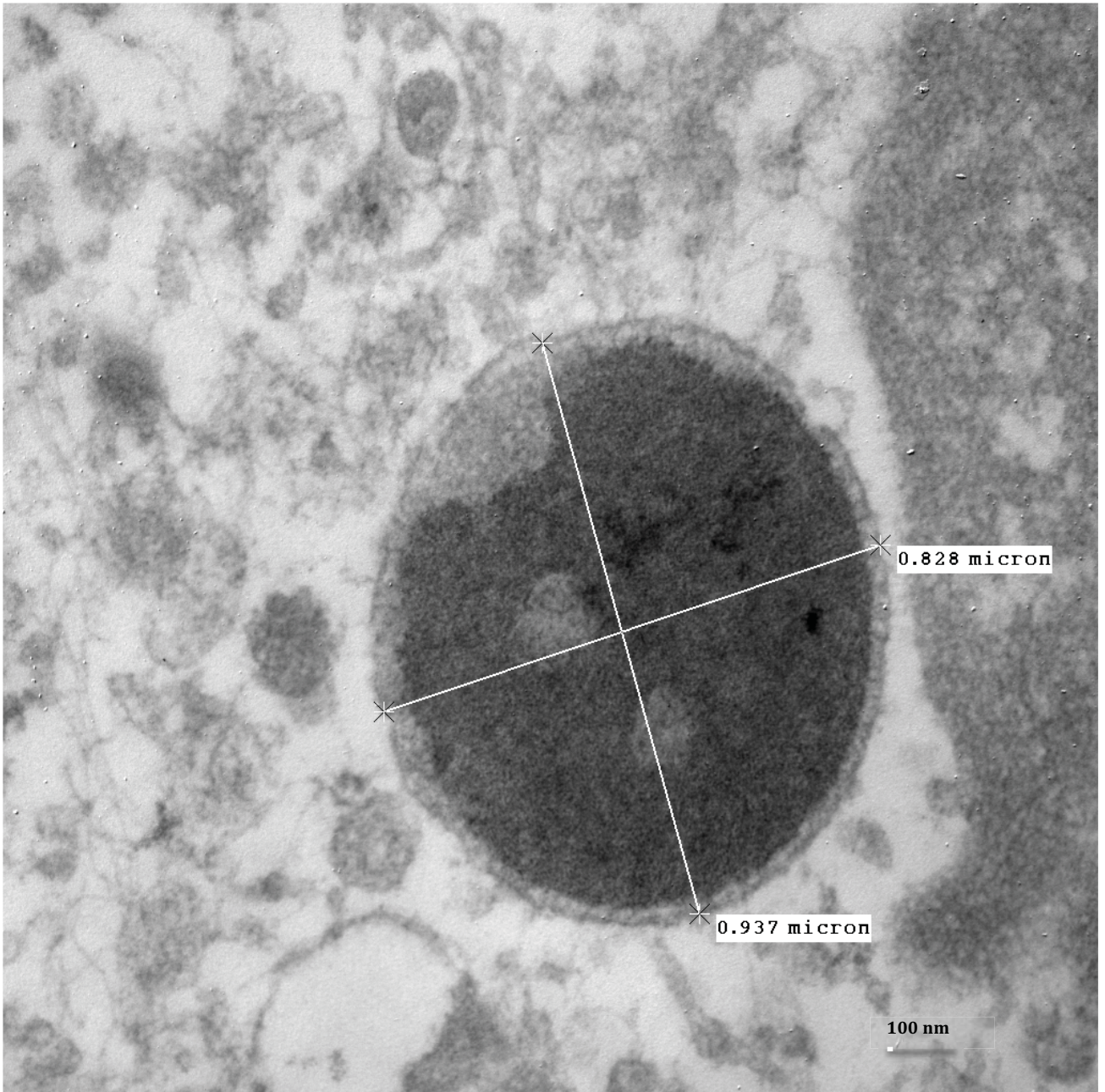


Figura 40. Micrografía de *Staphylococcus aureus* observado por Microscopia electrónica de trasmisión 75000X.

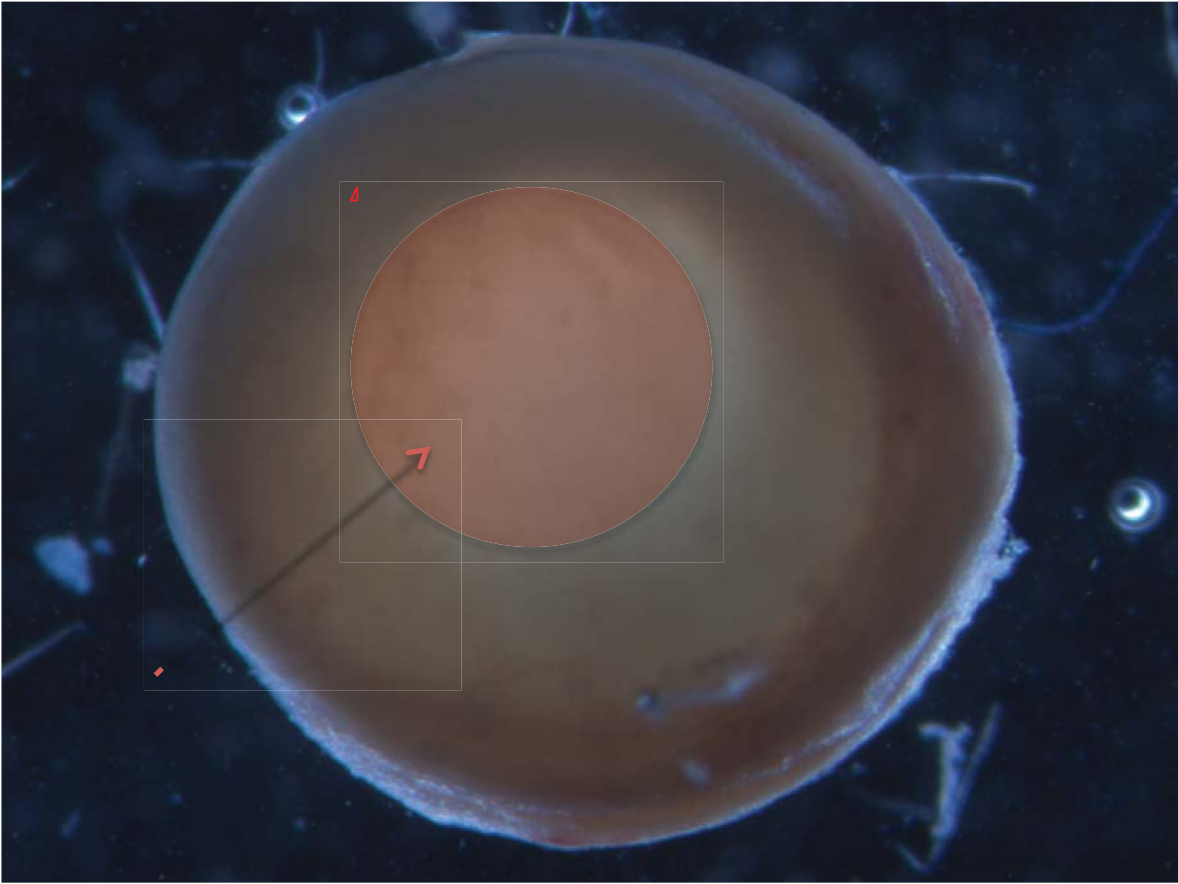


Figura 41. Micrografía con microscopio estereoscópico de doble iluminación 10X que muestra ojo con úlcera por *Fusarium solani*.

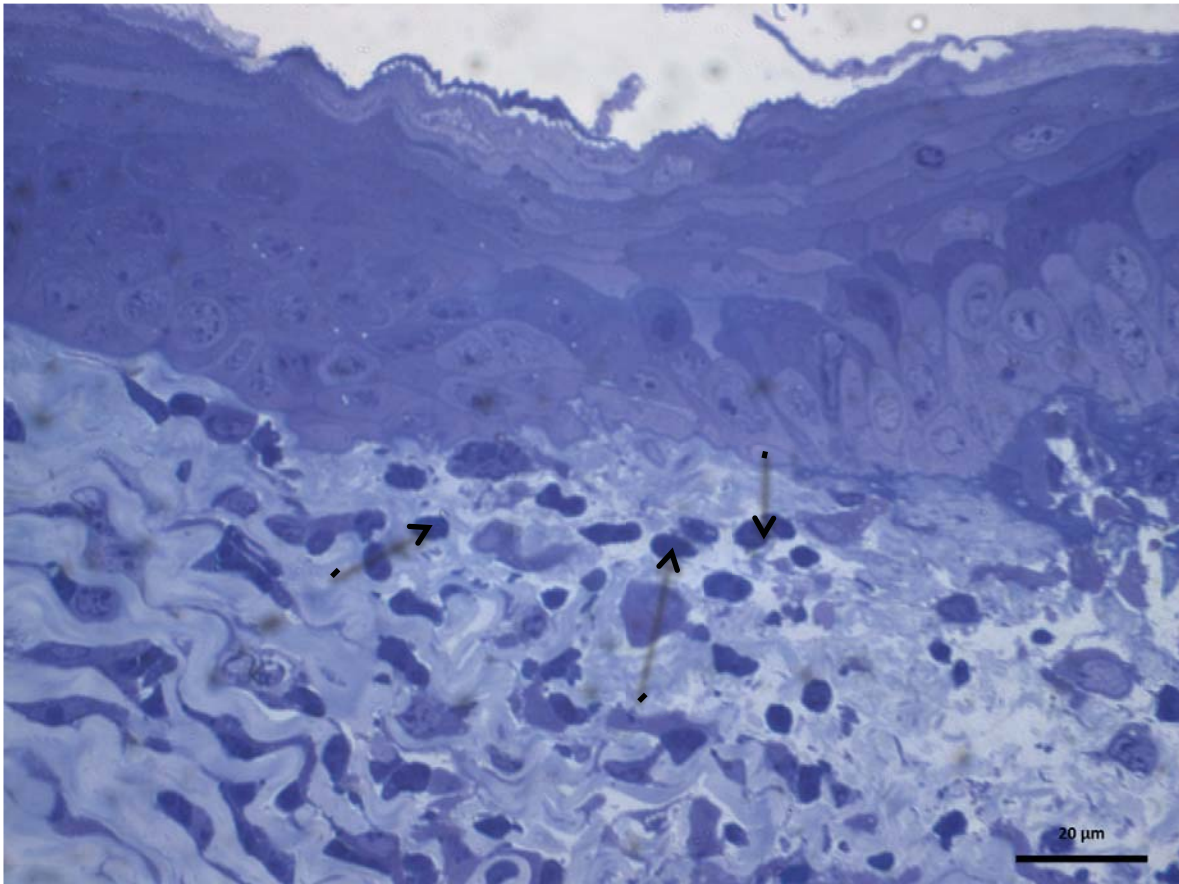


Figura 42. Micrografía de corte semifino teñida con azul de toluidina observada con microscopia óptica de campo claro 100X, se observa epitelio esfacelado de distribución alterada. En estroma se observa infiltración de abundantes células inflamatorias y presencia de conidios (flecha negra).

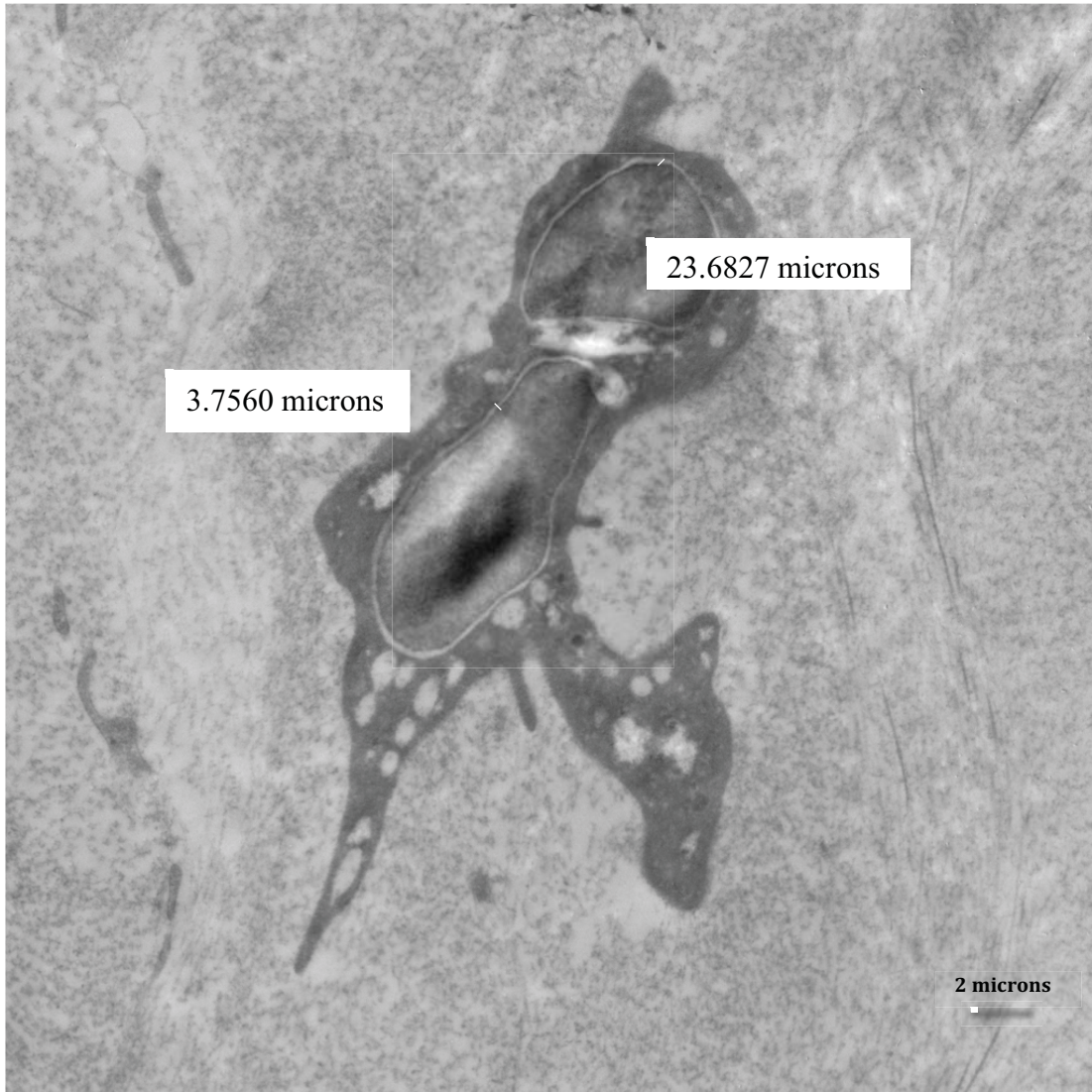


Figura 43 Micrografía por microscopía electrónica de trasmisión 4000X donde se observa al F. solani con pared bien definida rodeado por matriz extracelular de bordes no definidos.

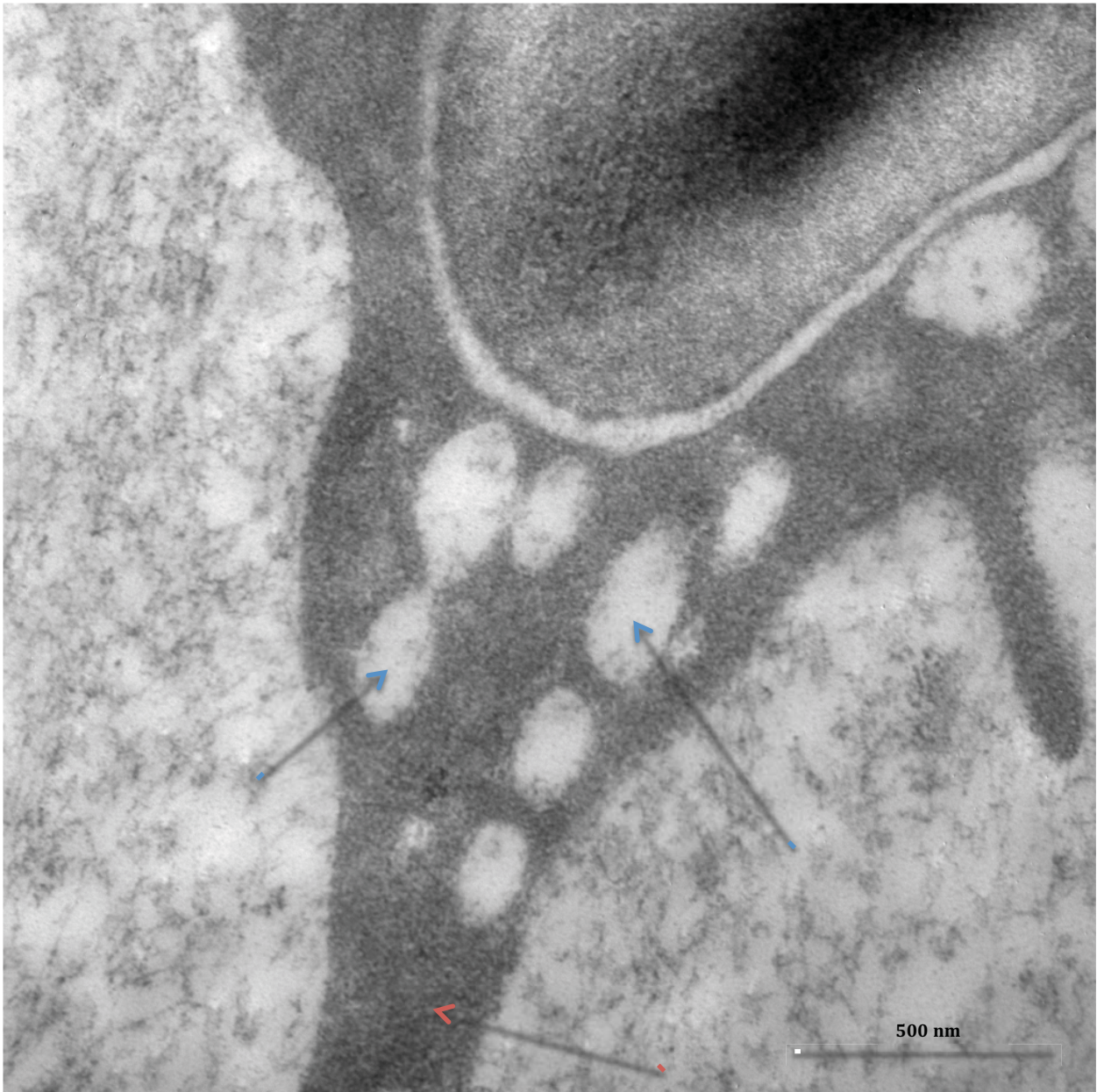


Figura 44. Micrografía por microscopía electrónica de trasmisión 60000X donde se observa a mayor aumento la matriz extracelular (flecha roja) y se observan espacios con una densidad similar a la del estroma circundante (flecha azul).



Figura 45. Micrografía con microscopio estereoscópico de doble iluminación 10X que muestra ojo con úlcera de etiología Mixta resaltada e indicada con marca roja.

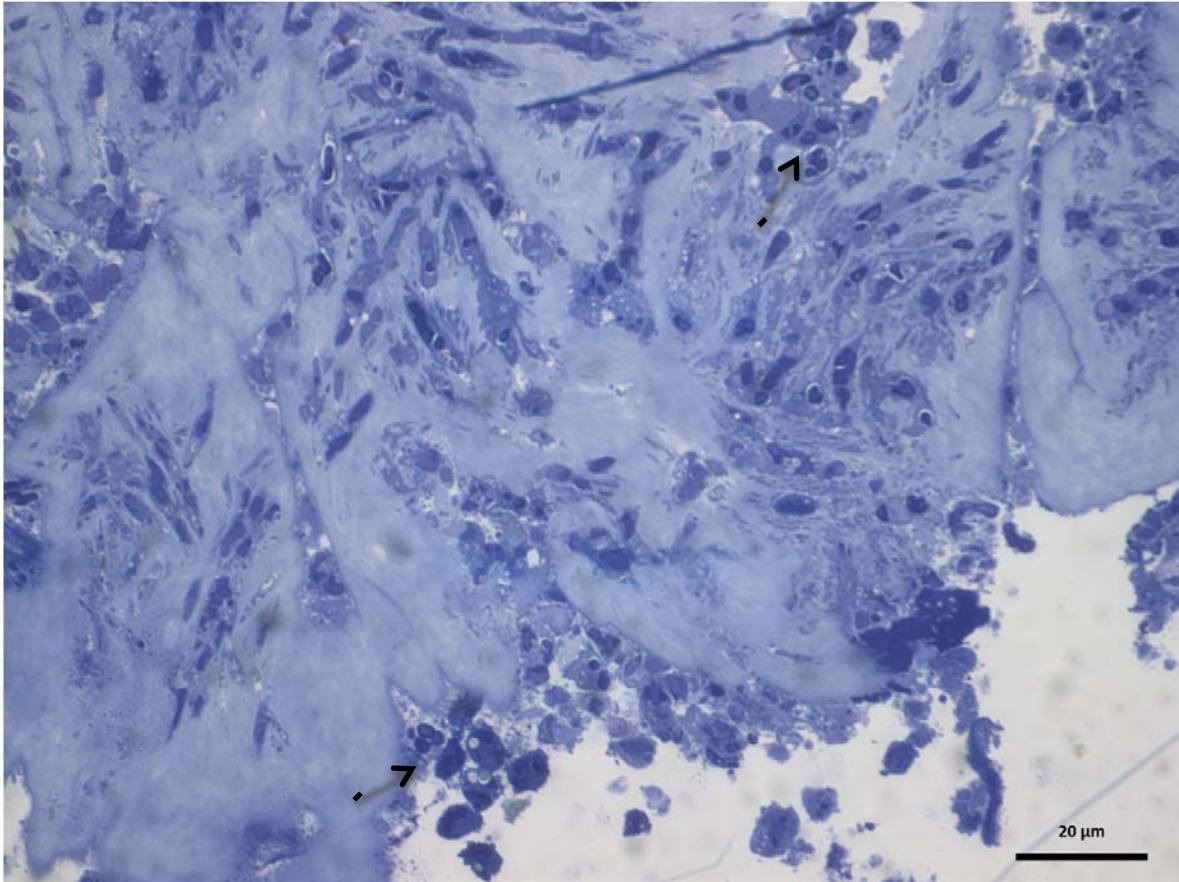


Figura 46. Micrografía de corte semifino teñida con azul de toluidina observada con microscopia óptica de campo claro 100X, estroma se observa infiltración de abundantes células inflamatorias y presencia de bacterias y conidias (flecha negra).

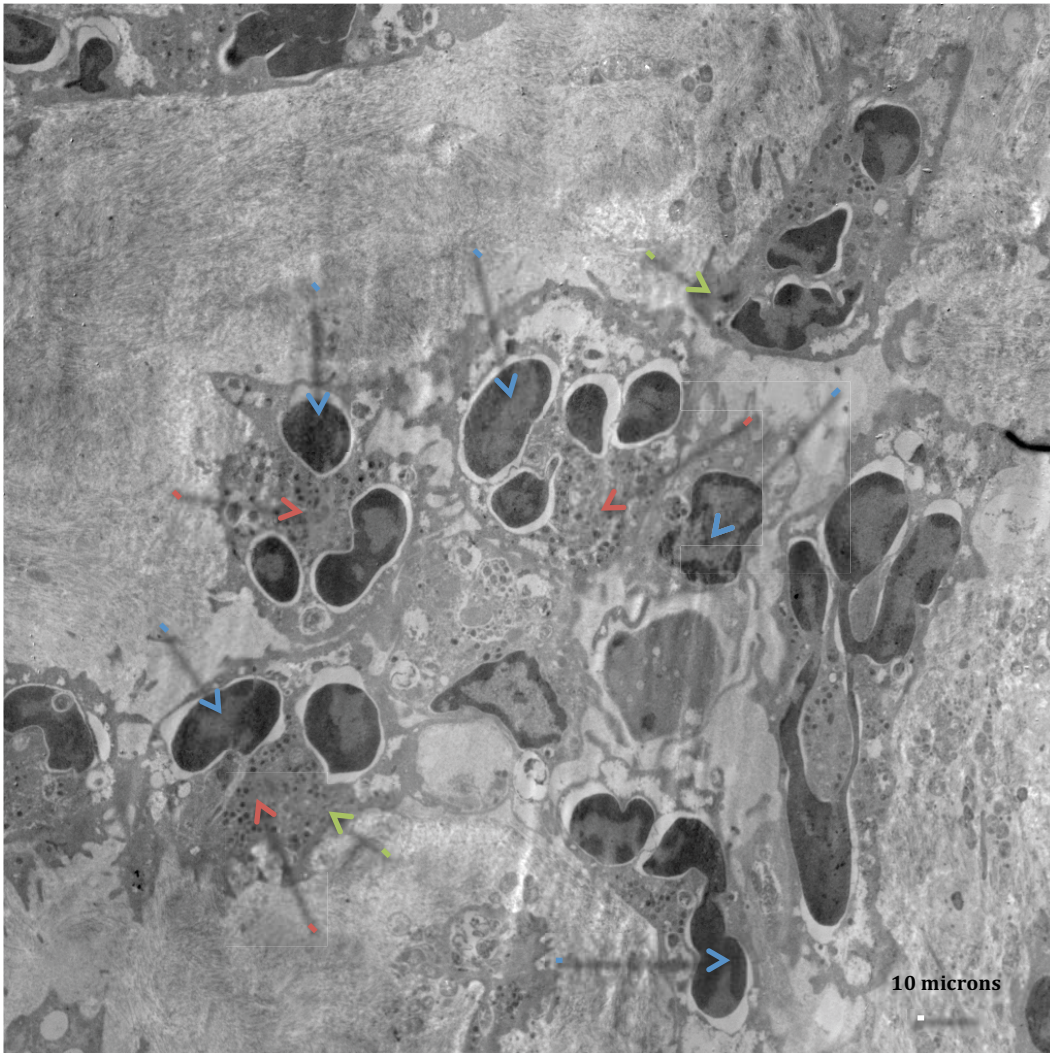


Figura 47 Micrografía de queratitis mixta observado por Microscopia electrónica de trasmisión 1000X donde se observan conidias bien definidas (flecha azul) rodeados por abundantes cocos (flecha roja) asociados por matriz extracelular.



Figura 48 Micrografía de queratitis mixta observado por Microscopia electrónica de trasmisión 5000X donde se observan conidias en proceso de apoptosis señalado por flecha azul, bien definidas rodeados por abundantes cocos (flecha roja) asociados por matriz extracelular (flecha verde).

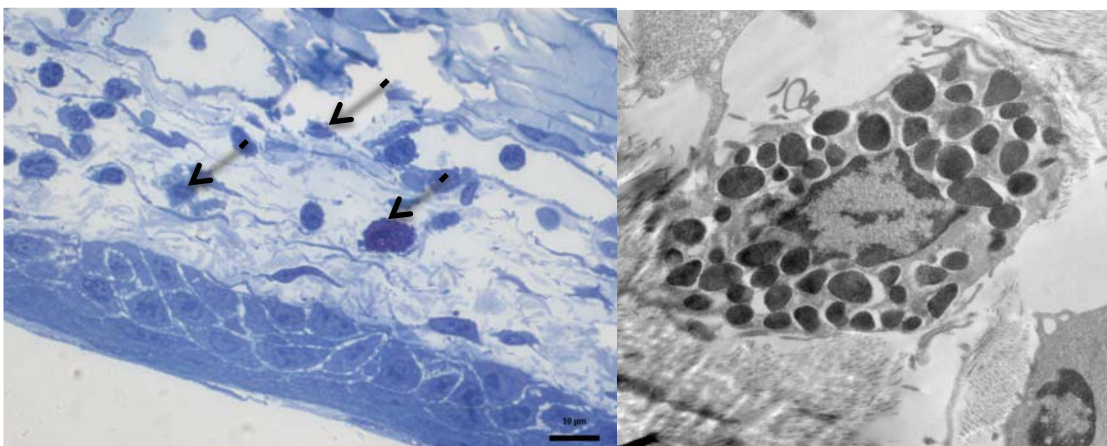


Figura 49. A. Micrografía de corte semifino teñida con azul de toluidina observada con microscopia óptica de campo claro 100X córnea con infección mixta, se observa cúmulo de células cebadas señaladas con la flecha negra. B. Micrografía de queratitis mixta observado por Microscopia electrónica de trasmisión 15000X donde se observa célula cebada.

12. Discusión

Los microorganismos que generan patología en la córnea comprenden muchas especies incluyendo hongos y bacterias (los más frecuentes) entre otros. Se han descrito detalladamente diferentes aspectos de las queratitis infecciosas: la adhesión microbiana, la patogenicidad corneal, el papel de las células del sistema inmune así como los mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa contra los diferentes microorganismos.

Estos microorganismos son capaces de generar infecciones solos o en combinación y diseminarse adhiriéndose al sustrato biológico formando colonias o grupos inmersos en una matriz extracelular compuesta de exopolímeros llamada biofilm. (Abelson 2012)

En el ensayo de medición cuantitativa de biofilm in vitro por cristal violeta se encontró que la matriz secretada por *Fusarium* fue mayor que la de *Staphylococcus* y la de infección mixta esto se debe al tipo de crecimiento, actividad metabólica y la variación de la morfología celular de los patógenos. (Beauvais A et al 2012)

El biofilm creado por *Fusarium solani* consta de canales que son estructuras especializadas para el transporte de agua, nutrientes y la excreción de residuos metabólicos. En las micrografías se observa la presencia de sustancias poliméricas extracelulares que rodean completamente las estructuras del hongo.

Se ha reportado que la matriz extracelular ayuda a fusionar el esqueleto de las hifas dando soporte a la estructura del hongo. Las hifas presentan anastomosis y la matriz extracelular los envuelve engrosando estas estructuras (Seider et al. 2008).

En el biofilm por *Staphylococcus* se observa la formación de microcolonias compactas embebidas en matriz extracelular unidos por interacciones de fuerzas de Van der Waals (Characklis WG et al 1983).

En este estudio se observó un efecto antagonista en la interacción establecida entre los aislados clínicos *Fusarium solani* y *Staphylococcus aureus* cuando fueron cultivados juntos *in vitro* e *in vivo*. No se encontraron reportes previos sobre esta interacción. Sin embargo, en un estudio *in vivo* reportan un efecto antagónico similar entre *Aspergillus fumigatus* y *Staphylococcus aureus*. (Ramirez-Granillo 2015).

Tanto en los resultados de este estudio como en el estudio con *Aspergillus*, *S. aureus* se mostró una inhibición constante sobre su contraparte fúngica en la formación de biofilm. Las micrografías tanto óptica de campo claro como la electrónica mostraron un desarrollo subnormal de las hifas, daño a las estructuras del hongo y alteraciones en la estructura de la matriz extracelular.

El antagonismo del *Staphylococcus* sobre *Fusarium* observado en las micrografías de campo claro y microscopia electrónica de transmisión, observado entre las bacterias y las conidias adyacentes puede explicarse por los metabolitos liberados por la bacteria y el hongo, lo cual puede causar una deformación apical (es un área de alta actividad enzimática), por lo hay una limitación en su crecimiento, lo anterior se ha descrito en combinación de *Staphylococcus aureus* con *Aspergillus* y *Salmonella* con *Aspergillus*. (Momany et al 2004 y Brandl et al 2011). Se ha descrito necrotrofismo extracelular como otra causa de lisis de las hifas y se sugiere que puede ser ocasionada por las exotoxinas producidas por *Staphylococcus* (Ikeda et al 2007).

Otro evento observado en la antibiosis de hongo-bacteria es que las prolongaciones de la conidia sirven como reconocimiento celular. Estas prolongaciones se hacen más evidentes cuando interactúan con la bacteria, tal como se ha visto en estudios descritos en pacientes con fibrosis quística por el ambiente del tracto respiratorio. Los autores mencionan una alta concentración de ADN libre derivado de los neutrófilos liberados durante el proceso inflamatorio. (Landa et al 2011). Así como hay liberación de ADN, también se liberan péptidos antimicrobianos; lo que ayuda a eliminar a la bacteria. Es posible que eso explique

que en la queratitis por *Staphylococcus aureus* del modelo murino el biofilm bacteriano sea menos evidente que el micótico. Lo anterior también puede ser explicado en el reporte de Shopova et al, quienes sugieren que el ADN extracelular confiere a los conidios soporte como superficie de adhesión en un sustrato biológico.

Mohan et al realizaron un modelo de queratitis similar al nuestro; ellos inocularon inoculando *Aspergillus fumigatus* y *Staphylococcus aureus* en la córnea de conejo. Los autores observaron que la úlcera mixta en sus animales fueron más pequeña comparadas con la úlcera por inoculación del hongo solo. Estos resultados son compatibles a los que obtuvimos en el modelo *in vivo*.

Se utilizaron diferentes fluorocromos para evidenciar los componentes del biofilm y su localización en la estructura de la matriz. En los resultados se observó un traslapamiento de ADN y polisacáridos en los sitios de anastomosis donde se unen las hifas lo que sugiere una función de soporte particularmente en la base del biofilm del hongo inoculado de forma independiente.

En el caso del biofilm mixto se evidenció fluorescencia rodeando a la hifa en menor intensidad al generado por *Fusarium* solo, lo cual sugiere una disminución de la actividad metabólica del hongo. En el estudio de Granillo et al. 2015, realizaron análisis de actividad metabólica con marcador FUN1 para un biofilm de *Aspergillus* con *Staphylococcus* y evidenciaron una disminución considerable de la actividad metabólica del hongo. Shopova et al 2013 reportaron que el ADN encontrado en la matriz extracelular confiere resistencia estructural cuando se encuentra inmerso en polisacáridos. Se cree que el ADN proviene de las células del hongo debido a la secreción de quitinasas que favorecen su liberación en las fases tempranas de la formación del biofilm.

Se observó una fluorescencia de la mezcla de los fluorocromos emitida por el biofilm mixto a diferencia del biofilm del hongo por sí solo. Lo cual sugiere que una mezcla de ADN y polisacáridos, esto refuerza la teoría de una antibiosis en la interacción hongo-bacteria, lo cual favorece la muerte del hongo por *Staphylococcus* al dañar la pared del hongo y liberando su ADN. (Rajendran et al. 2013)

El desarrollo del biofilm en la córnea fue reportado en el estudio de Saraswathi P et al de 2015, ellos demostraron su formación por *Pseudomona aeruginosa* en una queratitis inducida y evidenciaron estructuralmente sus etapas la formación. Al igual que en nuestros resultados, Saraswathi describió la presencia de colonias pequeñas de bacteria embebidas dentro de una matriz en una disposición en parches (estudiados por microscopia electrónica de barrido y microscopia electrónica de transmisión).

En las imágenes que obtuvimos en los cortes histológicos así como en las micrografías por microscopia electrónica de transmisión de las corneas infectadas se observaron un gran número de células inflamatorias rodeando el sitio de infección, los neutrófilos se observan de forma notable alrededor de la masa de bacterias. Estos resultados son compatibles con el estudio de Roberts et al de 2013 en el que tipifico biofilm en las amígdalas de pacientes pediátricos y de Johnson CJ et al de 2016 en el que describen la participación de neutrófilos y sus NETs en la formación de biofilm en infección por *Candida albicans*.

En un estudio de Chloe et al 2003 se observaron colonias de bacterias más complejas con variaciones en su apariencia morfológica en la información obtenida por microscopia de transmisión. Sin embargo en el estudio de Saraswathi et al 2015 en la queratitis por *Pseudomona* no hay modificación de la morfología o la matriz secretada por la bacteria.

Los microorganismos observados en las micrografías electrónicas de las corneas infectadas en este estudio (particularmente las bacterias) no se observaron definidos; esto puede deberse a que los microorganismos se encontraban enmascarados por la secreción de exopolisacáridos como lo reporta Ehrlich et al 2012 en su tipificación de biofilm en un modelo de otitis media.

Los estudios de microscopia de campo claro y la electrónica de transmisión aplicados en este estudio brindaron información de las las estructuras tridimensionales en mucosas, tal como lo recomienda Singhal et al de 2012.

Con las técnicas de imagen se observaron células cebadas en los cortes histológicos y en las micrografías electrónicas de las corneas infectadas con *Fusarium solani* y *Staphylococcus aureus* en combinación no así en las corneas

infectadas con los microorganismos individualmente. Las células cebadas son mejor conocidas por su participación en la mediación de respuestas alérgicas, también son importantes para la vigilancia de procesos patogénicos y la defensa de tejidos del tipo mucosa. (Abraham SN et al. 2010). Se han identificado en el limbo del humano desde hace 5 décadas pero no se ha estudiado su papel en los procesos patológicos en el segmento anterior o la superficie ocular, aparte de su participación en las alergias. (Iwamoto et al 1965)

Las células cebadas son leucocitos pleiotrópicos y representan un arma de doble filo en los procesos inflamatorio del segmento anterior, por un lado son los responsables de regular las alergias oculares y por el otro se ha descrito que las células cebadas limitan la inflamación, antagonizando el metabolismo de microorganismos, así como regulando la migración de los polimorfonucleares. Esto es concordante con la pérdida de la eficiencia del sistema inmune innato en ausencia de las células cebadas, tal como se demostró en un estudio de queratitis herpética en ratones *knock down*. (Royer DJ et al 2015)

En la infección mixta, donde hay liberación abundantes sustancias proinflamatorias, bactericidas liberadas por el hongo destruido por la bacteria, las células cebadas podrían tener un efecto regulador de la inflamación al evitar un daño excesivo al tejido del huésped.

Se podría pensar en una reacción de hipersensibilidad a los componentes de los microorganismos, pero únicamente se observó estas células en los tejidos de la córnea con infección mixta.

13. Conclusión

Los resultados de este estudio dan evidencia directa de la existencia de un biofilm en la córnea de ratón ante una infección inducida por *Fusarium solani*, *Staphylococcus aureus* y la combinación de ambos. Los resultados sugieren que los biofilms maduros son un componente de las queratitis infecciosas.

La conidiación de *Fusarium solani*, su filamentación y la subsecuente formación del biofilm es inhibida por el *Staphylococcus aureus* en la formación de un biofilm

mixto. Esta bacteria limita significativamente el crecimiento del hongo probablemente por contacto célula-célula y mediante la síntesis de toxinas. Lo anterior apoya el hecho de un mayor componente inflamatorio en las queratitis de etiología mixta en comparación con las de etiología bacteriana o micótica.

Esta información puede ser útil para determinar el impacto del biofilm en los esfuerzos terapéuticos.

14. Aspectos éticos:

El manejo de los animales (ratones) seguirá estrictamente las guías de uso de animales en investigación oftalmológica y de la visión publicadas por la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) incluida en la sección de Apéndices.

15. Aspectos de bioseguridad:

Las especificaciones técnicas para el cuidado de la producción y uso de animales de laboratorio descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM- 062_ZOO-1999. Los desechos biológicos serán manejados de acuerdo con la Norma NOM-087-ECOL-94.

16. Financiamiento de la Investigación:

Recursos de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de la Valenciana. Los investigadores no tienen ningún conflicto de intereses.

18. Apéndices:

Guía de uso de animales en investigación oftálmica y de la visión.

Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research

[Introduction](#)

[Guidelines for the design of experiments](#)

[Guidelines for the conduct of experiments](#)

[Factors that relate specifically to the conduct of vision and ophthalmology experiments](#)

[Investigators outside the United States](#)

[Animal use guidelines](#)

[Alternatives to animal research](#)

[Animal use resources](#)

[Organizations that promote proper and ethical use of laboratory animals](#)

Introduction

Research in vision and ophthalmology improves the quality of life. This improvement stems in part from progress in ameliorating human disease and disability, in part from advances in animal health and veterinary medicine, and in part from the enlargement of our understanding of human and animal life. Because so much of vision research is aimed at understanding the structure and function of complex and intricately connected biological systems, work with living animals is vital to continued progress in many areas of clinical and basic research on vision. The proper use of animals in research is an honorable and essential contribution to the improvement of human and animal lives.

Our concern for the humane treatment of animals obliges us always to establish that the potential benefits to human and animal health outweigh the cost in animal lives, and it is desirable for scientific societies such as The Association for Research in Vision and Ophthalmology to formulate guidelines for the humane use of laboratory animals in research.

The remainder of this document provides guidelines which are generally considered acceptable and reasonable by the biomedical research community. The guidelines are intended for the investigator who is responsible for the humane care and use of animals in research. The discussion deals mainly with warm-blooded vertebrates, but the principles can be applied generally. Ethical issues involving the use of any species should be considered in relation to the complexity of its central nervous system and its apparent awareness of its environment.

Guidelines for the design of experiments

The fundamental principle is that animals must not be subjected to avoidable distress or discomfort. The investigator's first concern must therefore be to avoid the use of animals when possible.

When it is established that animals must be used, the investigator's obligation is to minimize the animal's distress or discomfort, assessed by anthropomorphic judgments made by reasonable and prudent human observers. Although most research on animals causes little or no distress or discomfort, certain important scientific questions may demand experimental studies that inevitably give rise to discomfort or distress.

In such cases discomfort or distress must be minimized by careful experimental design involving the use of analgesics and/or anesthesia. There is no difference between distress and discomfort that result from the design of a study and distress or discomfort that are its unintended side effects. The investigator must therefore identify and eliminate all avoidable sources of discomfort or distress, taking advantage of veterinary expertise when necessary.

When designing studies that cannot be undertaken without animals, the investigator must justify the use of animals and the species and number needed to provide reliable information. Experiments should be designed to minimize the number of animals used and to avoid depletion of endangered species. Although a few experiments have a risk of unreliable results, advances in experimental methods, within-subjects designs, and modern statistical techniques all help reduce the number of animals used without compromising scientific quality.

Guidelines for the conduct of experiments

The quality of the information obtained through research depends in no small measure on the health and general condition of the animals used. Proper animal husbandry is fundamental to the success of any research effort that uses animals.

Research animals must be obtained and cared for in accordance with the recommendations of the [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#), Institute of Laboratory Animal Resources, the [Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals](#), and in Canada, the [Guide to the Care and Use of Experimental Animals by the Canadian Council of Animal Care](#) (if conducting research in Canada).

Experienced investigators can contribute very valuable information about the care of animals rarely used in the laboratory and about the use of animals in particular experimental situations.

Investigators in the United States must comply with relevant local, state and federal laws, including the [U.S. Animal Welfare Act](#), as amended, and its accompanying regulations. An Institutional Animal Care and Use Committee must review and approve the use of animals in vision research in the United States and Canada.

Surgery should be carried out or directly supervised by persons with appropriate levels of experience and training, and surgery performed on animals that will survive (for example, on animals intended for long-term studies) should be undertaken with careful attention to aseptic technique and prevention of infection. Major surgical procedures should be completed under anesthesia that will render the animal insensitive to pain. Muscle relaxants and paralytics have no anesthetic action and must not be used as a substitute for anesthesia. Postoperative care must include efforts to minimize discomfort and the risk of infection.

Some studies require surgical preparation of animals that are not intended to survive. In such cases the animals ordinarily should be maintained unconscious throughout the experiment. At the end of the experiment animals must be euthanized without recovering consciousness.

Where experiments require physical restraint and/or the withholding of food or

water, the effects of which are not themselves the objects of study, care must be taken to minimize discomfort or distress and to ensure that good general health is maintained. Only when there is no alternative procedure should animals be subjected to immobilization or restraint to which they cannot be adapted readily. Whenever it is not inconsistent with good experimental design, the experimental schedule should include reasonable periods of rest and readjustment. In the rare cases where distress and discomfort are unavoidable attributes of a well-designed study, the investigator must, within the limits of the design, take all possible steps to minimize these effects and to minimize the duration of the procedure and the number of animals used.

ARVO will amend The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research pending changes to US and EU guidelines ([FELASA](#) and [EU legislation](#)).

Factors that relate specifically to the conduct of vision and ophthalmology experiments

Besides the considerations generally applicable to all animal experiments, production of visual disability is a special animal welfare consideration that may apply to some vision research protocols. Visual disability of experimental animals may be either an intrinsic or an unplanned consequence of experimental design. In its definition of major survival surgery, [the Guide to the Care and Use of Laboratory Animals](#) includes any surgical intervention that has the potential for producing a permanent handicap in an animal that is expected to recover. Hence, any experimental procedure that results in, or has the potential to result in, a level of visual disability sufficient to disrupt an animal's normal daily activity should be considered a major survival procedure. Such procedures require appropriate justifications and suitable animal care accommodations.

Protocols involving bilateral survival ocular procedures require special consideration and justification, with particular attention to any visual consequences.

Such procedures include bilateral ocular surgeries, whether performed simultaneously or sequentially, and any other experiments with the potential to affect vision bilaterally. [The Guide to the Care and Use of Laboratory Animals](#) recommends that animals not be subjected to multiple major survival surgical procedures unless they are related components of a particular research project. Accordingly, a visually disabling procedure should not be performed bilaterally unless the two procedures are related components of a specific project. As noted in [the Guide to the Care and Use of Laboratory Animals](#), cost savings alone is not an adequate justification for performing multiple survival surgical procedures.

Vision investigators are encouraged to distribute unrelated tissues to investigators in other research areas and, where practical, to obtain suitable ocular tissues from investigators working on other organs. This recommendation applies to all species.

Inherited disorders of the visual system are significant health problems for both humans and animals. Even so, the breeding of animals with genetic disorders leading to blindness needs specific justification. Investigators who breed genetically impaired animals are encouraged to share such animals and tissues with qualified investigators having complementary expertise, including those outside their own institution.

Investigators outside the United States

Although the laws that regulate the care and use of animals in the United States are not directly applicable to citizens of foreign countries, ARVO endorses the policies in the [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#), the [Public Health Service Policy on the Humane Care and Use of Laboratory Animals](#) (revised 2002), and the [U.S. Animal Welfare Act](#), as amended. If ARVO is to support a vision scientist under scrutiny by animal activists, the vision science experiment involving animals must conform to the guidelines established in these documents, even though they are not necessarily enforceable by law in the country in which the

experiment is performed.

In addition to these Guidelines, references in the following resources are recommended.

Animal use guidelines

- [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals \(NRC2011\)](#): Main resource used by Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care's (AAALAC's) Council on Accreditation; also a primary reference on animal care and use (required if research is conducted with PHS funds).[The Guide](#).
- [Public Health Service \(PHS\) Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals](#)
- [NIH Grants Policy Statement \(2011\)](#)
- [Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook](#)
- 2008 Guidance for Researchers and Institutions: [Good animal care and good science go hand-in-hand](#).
- A tutorial for new animal care and use committee members, institutional administrators, investigators, animal care personnel and veterinarians. [OLAW PHS Humane Care and Use of Laboratory Animals Tutorial](#)
- [IACUC Bookmarks](#)
- NIH Medical Research with Animals Website: The site contains information for researchers and institutions, as well as the general public, including a fact sheet on the benefits of biomedical research, and a Frequently Asked Questions section. [NIH Medical Research with Animals website](#).
- [NIH iEdison](#): Helps government grantees and contractors comply with laws and regulations
- US Department of Agriculture (USDA), [Animal Welfare Act and Regulations](#) : a document with regulations to improve animal care and use in research, testing, teaching, and exhibition. See also, USDA [Animal Welfare Information Center](#)[FASS Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching](#)

- [Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research, National Academies Press](#)
- Canadian Council on Animal Care list of guidelines: [Guide to the Care and Use of Experimental Animals](#)
- Expectations of the major research council and charitable funding bodies: [Medical Research Council guide for the use of animals. Responsibility in the use of animals in bioscience research.](#)

Alternatives to animal research

- Bibliography on alternatives to animal testing: [ALTBIB](#)
- Global clearing house for information on alternatives to animal testing: [AltWeb](#)
- Center for Alternatives to Animal Testing (Johns Hopkins University): [CAAT](#)
- Animal use alternatives terminology (National Agricultural Library): [USDA Thesaurus](#)

Animal use resources

- Information Resources for adjuvants and antibody production: [USDA Antibodies](#)
- [NIH Model Organisms for Biomedical Research](#)

Organizations that promote proper and ethical use of laboratory animals

- Office of Laboratory Animal Welfare ([OLAW](#))
- Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations. [AFLAS](#).
- Canadian Association for Laboratory Animal Science. [CLAS](#).
- American Association for Laboratory Animal Science. [AALAS](#).
- Federation of European Laboratory Animal Associations. [FELASA](#).
- International Council for Laboratory Animal Science. [ICLAS](#).
- American College of Laboratory Animal Medicine. [ACLAM](#).
- Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International: This site contains a listing of international regulations and resources by country. [AAALAC Resources](#).

Bibliografia

- Tsiry Rasamiravaka,¹ Quentin Labtani,¹ Pierre Duez,² and Mondher El Jaziri. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms, *BioMed Research International* Volume 2015
- Makdoui K, Mortensen J, Crafoord S. Infectious keratitis treated with corneal crosslinking. *Cornea*. 2010 Dec;²⁹(12):1353-8
- Green M, Apel A, Stapleton F. Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea*. 2008 Jan;²⁷(1):22-7.
- Vazirani J, Vaddavalli PK. Cross-linking for microbial keratitis. *Indian J Ophthalmol*. 2013 Aug;⁶¹(8):441-4
- Elder MJ, Stapleton F, Evans E, Dart JK. Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye (Lond)*. 1995;⁹ (Pt 1):102-9.
- Chandra J, Pearlman E, Ghannoum MA. Animal models to investigate fungal biofilm formation. *Methods Mol Biol*. 2014;¹¹⁴⁷:141-57
- Zegans ME, Becker HI, Budzik J, O'Toole G The role of bacterial biofilms in ocular infections. *DNA Cell Biol*. 2002 May-Jun;²¹(5-6):415-20.
- Coenye T, Nelis HJ. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2010 Nov;⁸³(2):89-105.
- Paulo J. M. Bispo, Wolfgang Haas and Michael S. Gilmore, Biofilm in Infectios of the Eye; *Pathogens* 2015, 4, 111-136
- Lichtinger, A.; Yeung, S.N.; Kim, P.; Amiran, M.D.; Iovieno, A.; Elbaz, U.;

Ku, J.Y.; Wolff, R.; Rootman, D.S.; Slomovic, A.R.; et al. Shifting trends in bacterial keratitis in Toronto: An 11-year review. *Ophthalmology* 2012, 119, 1785–1790.

- David Lebeaux, Ashwini Chauhan, Olaya Rendueles, and Christophe Beloin. From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections; *Pathogens*. 2013 Jun; 2(2): 288–356.
- Fulcher TP1, Dart JK, McLaughlin-Borlace L, Howes R, Matheson M, Cree I. Demonstration of biofilm in infectious crystalline keratopathy using ruthenium red and electron microscopy. *Ophthalmology*. 2001 Jun;108(6):1088-92.
- Makdoui K, Mortensen J, Crafoord S., Response to: Evaluation of combined riboflavin and ultraviolet A as an alternative treatment for keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013
- Bourcier T, Sauer A, Letscher-Bru V, Candolfi E. [Fungal keratitis]. *J Fr Ophthalmol*. 2011 Oct;34(8):563-7. doi: 10.1016/j.jfo.2011.03.001. Epub 2011 May 5.
- Thomas PA, Kaliyamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Mar;19(3):210-20. doi: 10.1111/1469-0691.12126. Epub 2013 Feb 9.
- Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *Biomed Res Int*. 2015;2015:759348. doi: 10.1155/2015/759348. Epub 2015 Mar 19.

- Saraswathi P, Beuerman RW. Corneal Biofilms: From Planktonic to Microcolony Formation in an Experimental Keratitis Infection with *Pseudomonas Aeruginosa*. *Ocul Surf*. 2015 Oct;13(4):331-45. doi: 10.1016/j.jtos.2015.07.001. Epub 2015 Jul 26.
- Hernandez-Camarena, Julio C. MD^{*†}; et al Trends in Microbiological and Antibiotic Sensitivity Patterns in Infectious Keratitis: 10-Year Experience in Mexico City, *Cornea*: July 2015 - Volume 34
- Adderson E1, Pavia A, Christenson J, Davis R, Leonard R, Carroll K. A community pseudo-outbreak of invasive *Staphylococcus aureus* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000 Jul;37(3):219-21.
- Dyavaiah M1, Ramani R, Chu DS, Ritterband DC, Shah MK, Samsonoff WA, Chaturvedi S, Chaturvedi V. Molecular characterization, biofilm analysis and experimental biofouling study of *Fusarium* isolates from recent cases of fungal keratitis in New York State. *BMC Ophthalmol*. 2007 Jan 30;7:1.
- Abelson MB, McLaughlin J. Of biomes, biofilm and the ocular surface. *Rev Ophthalmol*. 2012;19:52
- Ramírez Granillo A1, Canales MG2, Espíndola ME3, Martínez Rivera MA4, de Lucio VM5, Tovar AV6. Antibiosis interaction of *Staphylococcus aureus* on *Aspergillus fumigatus* assessed in vitro by mixed biofilm formation. *BMC Microbiol*. 2015 Feb 15;15:33.
- Beauvais A, Schmidt C, Guadagnini S, Roux P, Perret E, Henry C, et al. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiol*. 2007;9:1588–1600.

- Seidler MJ, Salvenmoser S, Müller FM. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:4130–4136. doi: 10.1128/AAC.00234-08.
- Characklis WG, Cooksey KE. Biofilms and microbial fouling. In: Laskin AI, editor. *Advances in Applied Biotechnology*. New York: Academic; 1983. pp. 93–133
- Momany M, Lindsey R, Hill TW, Richardson EA, Momany C, Pedreira M, et al. The *Aspergillus fumigatus* cell wall is organized in domains that are remodelled during polarity establishment. *Microbiology.* 2004;150:3261–3268. doi: 10.1099/mic.0.27318-0.
-
- Ikeda R, Saito F, Matsuo M, Kurokawa K, Sekimizu K, Yamaguchi M, et al. Contribution of the mannan backbone of cryptococcal glucuronoxylomannan and a glycolytic enzyme of *Staphylococcus aureus* to contact-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol.* 2007;189:4815–4826. doi: 10.1128/JB.00412-07
- Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA–peptide complexes in systemic Lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2011;73:19
- Mohan M, Sangawe JL, Mahajan VM. Pathogenesis of experimentally produced corneal ulcers in rabbits. *Ann Ophthalmol.* 1984;16:246–248.
- Rajendran R, Williams C, Lappin DF, Millington O, Martins M, Ramage G. Extracellular DNA release acts as an antifungal resistance mechanism in mature *Aspergillus fumigatus* biofilms. *Eukaryot Cell.* 2013;12:420–429. doi: 10.1128/EC.00287-12

- Shopova I, Bruns S, Thywissen A, Kniemeyer O, Brakhage AA, Hillmann F. Extrinsic extracellular DNA leads to biofilm formation and colocalizes with matrix polysaccharides in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol.* 2013;141:1–11
- Johnson CJ, Cabezas-Olcoz J, Kernien JF, Wang SX, Beebe DJ, Huttenlocher A, Ansari H, Nett JE. The Extracellular Matrix of *Candida albicans* Biofilms Impairs Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *PLoS Pathog.* 2016 Sep 13;12(9):e1005884.
- Roberts AL, Connolly KL, Kirse DJ, et al. Detection of group A *Streptococcus* in tonsils from pediatric patients reveals high rate of asymptomatic streptococcal carriage. *BMC Pediatr* 2012;12:3
- Ehrlich, G.D., Veeh, R., Wang, X. et al, Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA.* 2002;287:1710–1715
- Singhal, D., Boase, S., Field, J. et al, Quantitative analysis of in vivo mucosal bacterial biofilms. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2012;2:57–62
- Abraham SN,, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10: 440–452.
- Iwamoto T,, Smelser GK. Electron microscope studies on the mast cells and blood and lymphatic capillaries of the human corneal limbus. *Invest Ophthalmol.* 1965; 4: 815–834
- Royer DJ1, Zheng M2, Conrady CD1, Carr DJ3. Granulocytes in Ocular HSV-1 Infection: Opposing Roles of Mast Cells and Neutrophils. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015 Jun;56(6):3763-75